RENATA AVANCINI FERNANDES

**Estudo de Longo Prazo do Tratamento Farmacológico com
Multi-Fármacos das Alterações Patofisiológicas do
Modelo Canino de Distrofia Muscular (GRMD)**

São Paulo
2012

RENATA AVANCINI FERNANDES

**Estudo de Longo Prazo do Tratamento Farmacológico com
Multi-Fármacos das Alterações Patofisiológicas do
Modelo Canino de Distrofia Muscular (GRMD)**

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 Doméstico e Silvestres

Orientador:

Prof^ª Dr^ª Maria Angélica Miglino

São Paulo

2012

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.2722
FMVZ

Fernandes, Renata Avancini
Estudo de Longo Prazo do Tratamento Farmacológico com Multi-Fármacos das Alterações
Patofisiológicas do Modelo Canino de Distrofia Muscular (GRMD) / Renata Avancini
Fernandes. -- 2012.
153 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Distrofia Muscular de Duchenne. 2. GRMD. 3. Multi-fármacos. 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 "Estudo de longo prazo do tratamento farmacológico com multi-fármacos das alterações patofisiológicas do modelo canino de distrofia muscular (GRMD)", protocolado sob o nº 1979/2010, utilizando 14 (quatorze) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, 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 27/10/2010.

We certify that the Research "Study of long-term treatment with multi-pharmacological drugs of changes pathophysiology of canine model of muscular dystrophy (GRMD)", protocol number 1979/2010, utilizing 14 (fourteen) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, 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 10/27/2010.

São Paulo, 28 de outubro de 2010

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERNANDES, Renata Avancini

Título: Estudo de longo prazo do tratamento farmacológico com multi-fármacos das alterações patofisiológicas do modelo canino de distrofia muscular (GRMD)

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus toda a vitória alcançada desde o início de minha vida. A minha vida é do Mestre.

A minha família, pois me deram todo o suporte de amor, carinho, apoio e incentivo.

Luiz, cada dia ao seu lado me fez acreditar que o dia de hoje chegaria. Eu te amo. Meu marido, companheiro, amigo, meu amor... Meu anjo, obrigada por ter me presentear com o melhor de você, sempre. Obrigada por ser pai da minha maior riqueza, nossa filha, nossa vida, nossa Larissa.

Larissa, desde o dia em que te senti dentro de mim, tudo o que eu faço, é por você. Seus sorrisos, gargalhadas, seus olhares, seus beijinhos, o seu abraço, é o que me conforta todos os dias, é o que me alimenta, o que me sustenta a nunca desistir. Por você, minha pequena, eu acordo todos os dias, eu respiro, trabalho, estudo, cozinho, limpo, sorrio, existo. Te amo minha vida, minha riqueza, minha essência, minha inspiração, minha filha.

Aos pacientes de distrofias musculares, NUNCA vamos desistir!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Maria Angélica Miglino por cada palavra e por todas as lições, que certamente se tornam oportunidades pela vida. Querida professora, eu a admiro muito, pela mulher competente, guerreira e sincera que a senhora é. Obrigada por cuidar de nós, seus alunos. Obrigada tudo o que representa na minha e tantas outras vidas.

Ao meu co-orientador, Dr David Feder, que desde 2008, quando eu entrei neste programa de pós graduação, passei a admirá-lo e respeitá-lo. Dr David, sua luta, é minha luta. Obrigada, conte comigo, conte com minha gratidão e esforço por essa causa. Deus está do nosso lado, nunca vamos desistir.

Dra Paula Fratini, você participou desde o início desde grande projeto, o qual eu me orgulho demais, obrigada por tudo, e principalmente por existir na vida dos nossos pequeninos GRMD. A sua ajuda, foi além de colaboradora, foi teve tanta paciência comigo, com esse projeto... você foi incrível! Gostaria de tê-la para sempre na minha vida e de minha família. Eu a respeito demais Paulinha, de coração.

Dra Ana Cláudia O. Carreira, sua colaboração foi imprescindível para o sucesso desse projeto, suas análises e principalmente sua capacidade, a fizeram peça chave para a conclusão desse estudo, o qual tanto me orgulho. Você sempre muito educada e disposta, mesmo com tanto trabalho e projeto em que auxilia, me parece ser uma mulher 1001 utilidades! Obrigada.

Prof Dr Vicente Borelli, são tantas as experiências vividas por ti, que o fazem tão importante para a composição de mais esse capítulo em minha vida. Seu empenho e dedicação pela educação é um exemplo para nós, “aspirantes” docentes.

Ao meu pai, Marco Antonio Fernandes, meu rei, o homem que participou dos meus ensinamentos do que é honestidade, amor, justiça e bondade. Você, papai que amo,

me “inspirou” para seguir essa profissão, a medicina veterinária, e olha onde estou chegando! Eu sempre soube que você estaria aqui, sempre!

Minha mãe, Magaly Avancini Fernandes, minha rainha, meu porto-seguro, que me criou da melhor forma que alguém pode ser criado. Em você, mamãe querida, me inspiro para cuidar da minha família, uma esposa excepcional e uma mãe muito consciente, as vezes até demais. Honesta, trabalhadora, linda, você é incrível mãe. Eu me orgulho demais por ser sua filha!

Meu irmão, Bruninho, o segundo pai de minha filha, não tenho muito o que dizer, pois te escolhi para ser padrinho da Larissa, por acreditar muito nos seus conceitos como ser humano, que são muito parecidos com os meus. Jaque, já faz tempo que deixou de ser cunhada e passou a ser minha irmã. Obrigada, pois junto com o Bruninho, são imprescindíveis na vida da minha “vida” Lalá.

Minha irmã Carolzinha e meu príncipe Luquinhas, eu amo demais vocês, o carinho e os bons momentos fizeram parte dessa trajetória, e sem dúvida alguma, estaremos para sempre juntos, amor eterno.

Meus avós, Totó, Guigui, Mauro e Nini, eu amo tanto, mas tanto vocês, que chega a doer. Vovô Totó, toda a admiração que sentem por você, é pouco perto do amor que sinto por ti, um exemplo de tudo aquilo que eu almejo na minha vida. Guigui, minha vovozinha gostosinha, quitutes que me deixam bem nutrida até hoje, você é meu anjo. Vovô Mauro, suas palavras e principalmente suas histórias, nos fazem acreditar que tudo vai ficar bem! Vovó Nini tudo o que tenho para agradecê-la é pouco, tanto carinho, tanto amor, tanta disposição, tanto “tanto” é o que a senhora faz por nós!

Minha cunha Bruna, sem sua ajuda com a Lalá, tudo teria sido bem mais difícil. Obrigada por tudo, pela paciência, pela companhia, pela ajuda! Minha sogra, que nos ajuda até hoje a sonhos se tornarem realidade.

Minha amiga “Caror” Costola, ah... são 15 anos de irmandade! Muitas festas, baladas, choros, risadas, frio, calor, dores de barriga, noite mal dormidas, noites estudando (rs)... caramba, quanta história, quanta amizade, amor, carinho, cumplicidade. Brigamos, reatamos, brigamos e reatamos... Isso se chama amizade com amor verdadeiro! Eu te amo minha amiga, e sabemos que sempre queremos nosso bem!

Minha amiga-irmã morena, Di, Dilayla... já faz tanto tempo que nos conhecemos, ou melhor, tantas vidas, né? Sabemos nos nossos corações, que a amizade é verdadeira, sincera e eterna, como sempre foi. O carinho que você tem pela nossa Lalá, me faz ter certeza do quanto somos reais! Te amo morena!

Marcão, Sarmento (de cima), Valdeco, vocês são tão legais! Marcão, sempre com uma palavra amiga de incentivo, fazendo com que tudo fique mais leve; Sarmetinho, caro amigo, suas palavras sempre engraçadas, sua histórias são demais, sua presença é sempre bem vinda; Valdeco, mesmo sem palavras, gosto demais de você, kkk, de verdade, 2012 foi muito bom começando com você ao nosso lado!

Amandinha, você acabou de chegar e já conquistou a todos nós, especialmente a mim e a Lalá! Adoro você, sua dedicação, seu foco, seus pensamentos e acima de tudo as suas atitudes, a tornam muito bem vinda a minha vida e ao meu seleto grupo de amigos.

Aline, desde que ouvi “a dona aranha subiu pela parede” vi o quanto você é legal! Te conhecendo melhor nesse finalzinho, faço questão de tê-la sempre conosco. Você e o Diego são dois queridos!

Grupo do canil, Luiz, Di, Amandinha, Marcio, Aline, Horácio, Mariana, Bárbara, Elaine (mesmo abandonando SP), Paulinha, Thais, Marina e Dani. Vocês são incríveis! Eu os vejo como anjos de verdade, o trabalho do grupo só deu certo, porque somos um grupo de verdade. Nunca permitimos que nosso particular, interferisse nos nossos anjinhos de quatro patas. Isso nos fez amadurecer a cada dia. Eu torço e oro para que a paz, a

união, o amor, o carinho e o respeito, continuem sendo as únicas verdades dentro daquela casa, que muitos chamam de biotério. Aos que ficam, tenham a certeza que sempre estarei com vocês, pois a vida daqueles anjinhos é muito importante para mim.

Augusto querido, você é peça fundamental no nosso trabalho, sua capacidade na lida com os cães, seu empenho, sua responsabilidade, fizeram o meu e tantos outros trabalhos darem certo. Obrigada, seja muito feliz!

Aos funcionários Índio, Jaque, André (Bebel), Ronaldo, Maicon, Rose Eli, Rose secretária, Diogo, meninas da limpeza (passaram tantas!), meu “muitíssimo” obrigada. Índio, você me viu crescer e espero que continue vendo por muito tempo! Jaque, educação e amizade; Bebel, meu “ex” colega de pós graduação, você é bom demais e sempre ajudou, em tudo para tudo; Ronaldo e Rose Eli, obrigada pelo auxílio quando foi necessário. Rose secretária, você é uma mulher muito bacana. Maicon, você é muito educação, competente, mas na verdade, é meu amigo! E nunca deixou que o profissional abalasse o que vêm do coração, obrigada meu querido! Meninas da limpeza, todas, sempre cantando, limpando, sorrindo, festejando, o dia começa bem quando chegamos e vocês estão lá! Diogo, obrigada por ajudar e muito na execução desse trabalho.

Diogo (de novo) meu amigo, e Jojo, minha amiga querida, nossa amizade é de verdade! Eu tenho certeza que nossa amizade vai por toda uma vida!

Gra Pignatari, admiro de verdade o que faz e o que você é. Quero ver Pedrinho e Lalá brincando muito ainda!

Sônia Will, não me surpreendi quando me socorreu aos 47 do segundo tempo, porque sempre soube o quanto você é especial.

Thiago Aloia, seus conhecimentos na “imuno” me salvaram! Quando tudo dava errado, só restava o Thiago, e você esteve lá para me ajudar, sem pedir nada em troca, nada mesmo, simplesmente por ser um cara legal! Obrigada!

Professores: Assis, Bombonato, Edson Liberti; Patrícia Castelucci, Cajú, Dani, Paula Papa, Kfoury, Allan, vocês nos ajudam em cada dia da pós graduação. Fazem parte de nossas vidas.

Silvinha e Carol, vocês sempre foram tão legais comigo, tornaram meus dias de USP mais prazerosos, de coração! O bom humor faz milagres!

Companheiros de pós: alunos da Miglino: Phelipinho, Erika, Greyson, Fer, Nathia, Álvaro, Bruno Mineiro, Amanda, Catarina, Day, Lorena, Horácio; alunos do Assis: Bertassoli, Natal, Maria Angélica, Paulo, Dani, Marcelo (companheiro e primo); alunos do Kfoury: Gra, Fer, Lê, Pedro, Rê Fontaneli; alunas da Paula Papa: Rê, Vanessa e Lu; alunos do Bombonato: Caio, Rafael, Yuri, Fernanda e Camila. Alunos da Paty e Gra: Fabi, Isa e João. Obrigada pela cumplicidade nos diversos momentos em que estivemos juntos.

Um agradecimento sincero para toda a equipe da Faculdade de Medicina de Santo André. Dr Fernando que me recebeu e se interessou muito por nossa pesquisa. Dra Beatriz que desenhou comigo os primeiros *primers* a serem usados nesse trabalho.

Meninas da biblioteca e da pós-graduação, que trabalham muito para que possamos estar aqui!

*“O Senhor te guardará de todo o mal; guardará a tua alma;
O Senhor guardará a tua entrada e a tua saída,
desde agora e para sempre”.*

Salmo 121; 7-8.

RESUMO

FERNANDES, R.A. **Estudo de longo prazo do tratamento farmacológico com multi-fármacos das alterações patofisiológicas do modelo canino de distrofia muscular (GRMD).** [Study of long-term treatment with multi-pharmacology drugs used in pathophysiology of Golden Retriever Muscular Dystrophy]. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A Distrofia Muscular dos cães Golden Retriever (GRMD), é uma miopatia degenerativa causada pela ausência de uma proteína, a distrofina, geneticamente homóloga à distrofia muscular de Duchenne que acomete humanos, portanto, estes cães são considerados modelos experimentais para estudos que buscam tratamentos para esta doença progressiva e sem cura. Neste trabalho, foram selecionadas sete diferentes medicamentos, entre eles: Sildenafil; Ácido ursodesoxicólico; Acetilcisteína; Losartana Potássica; Micofenolato de Mofetila; Talidomida e Diltiazem, formando um coquetel de medicamentos com a finalidade de tratar os efeitos deletérios causados pela distrofia muscular, proporcionando dessa forma, uma melhor qualidade e sobrevida para os pacientes distróficos. Cada medicamento foi escolhido pela sua ação: sildenafil, aumento do óxido nítrico; ácido ursodesoxicólico, antiinflamatório; Acetilcisteína, antioxidante; Losartana Potássica, antifibrótico e cardioprotetor; Micofenolato de Mofetila, imunossupressor; Talidomida, antiTNF; diltiazem, bloqueador dos canais de cálcio. Para o experimento, foram utilizados 6 cães machos GRMD, sendo 2 controle e 4 experimentais, com o tratamento iniciado aos 80 dias até 10 meses de idade. Os animais foram avaliados em diferentes momentos, com exames séricos, histologia básica, imuno-histoquímica e PCR. Após avaliações, podemos concluir que o coquetel de medicamentos, não causou melhora clínica nos cães do grupo experimental. A dosagem de leucócitos, TGP, CK e a expressão de NF κ B e TGF β 1 foi menor no grupo experimental comparado com o grupo controle, sugerindo uma melhora do processo inflamatório e tardia progressão da distrofia muscular no grupo experimental.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne. GRMD. Multi-fármacos.

ABSTRACT

FERNANDES, R. A. **Study of long-term treatment with multi-pharmacology drugs used in patophysiology of Golden Retriever Muscular Dystrophy.** [Estudo de longo prazo do tratamento farmacológico com multi-fármacos das alterações patofisiológicas do modelo canino de distrofia muscular (GRMD)]. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), is a degenerative myopathy caused by the absence of a protein, dystrophin, genetically homologous to the Duchenne Muscular Dystrophy that affects humans, so these dogs are considered experimental models for studies that seek treatments for this progressive disease with no cure. In this work, we selected seven different medications, including: Sildenafil, Ursodeoxycholic Acid, Acetylcysteine, Losartan Potassium, Mycophenolate mofetil, Thalidomide and Diltiazem concomitantly forming a cocktail of drugs in order to treat the deleterious effects of muscular dystrophy, thereby providing a better quality and survival for patients dystrophic. Each drug was chosen for its action: sildenafil, increasing nitric oxide; ursodeoxycholic acid, anti-inflammatory; acetylcysteine, an antioxidant; losartan, antifibrotic and cardioprotective; mycophenolate mofetil, an immunosuppressant; thalidomide, antiTNF; Diltiazem, calcium channel blocker. For the experiment, 6 male dogs were utilized GRMD, and two control and four experimental. Treatment started with 80 days to 10 months of age. The animals were evaluated at different times with serum levels, basic histology, immunohistochemistry and PCR. After the evaluations, we conclude that the cocktail of drugs, no clinical improvement in the experimental group. The dosage of leukocytes, ALT, CK and NF κ B and TGF β 1 expression was lower in the experimental group compared with the control group, suggesting an improvement in the inflammatory process and delayed progression of muscular dystrophy in the experimental group.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy. GRMD. Multi-drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Heredograma da DMD	32
Figura 2	Complexo distrofina-glicoproteínas	33
Figura 3	Mecanismo de ação da Losartana	43
Figura 4	Mecanismo de ação dos fármacos na patofisiologia da DMD	48
Figura 5	Análise de PCR para o gene Xp21.....	76
Figura 6	Representação gráfica das concentrações séricas (mm ³) de leucócitos em diferentes momentos.....	80
Figura 7	Dados estatísticos dos valores de leucócitos	81
Figura 8	Representação gráfica das concentrações séricas (%) de hematócrito em diferentes momentos.....	81
Figura 9	Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de plaquetas em diferentes momentos	82
Figura 10	Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) da uréia em diferentes momentos	84
Figura 11	Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) da creatinina em diferentes momentos.....	85
Figura 12	Representação gráfica das concentrações séricas (U/L) do TGP em diferentes momentos	87
Figura 13	Estatística do grupo controle e experimental dos valores de TGP....	88
Figura 14	Representação gráfica das concentrações séricas (U/L) da fosfatase alcalina em diferentes momentos.....	89
Figura 15	Representação gráfica das concentrações séricas (U/L) de creatinina quinase em diferentes momentos	90
Figura 16	Médias estatísticas de creatina quinase, nos grupos controle e experimental	92
Figura 17	Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) de albumina em diferentes momentos	93
Figura 18	Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) de proteína total em diferentes momentos	94

Figura 19	Coloração de Hematoxilina-eosina em corte bíceps femoral do grupo controle.....	98
Figura 20	Coloração de Hematoxilina-eosina em corte de bíceps femoral do grupo experimental	100
Figura 21	Coloração de Tricomo de Masson em corte de bíceps femoral do grupo controle.....	102
Figura 22	Coloração de Tricomo de Masson em corte de bíceps femoral do grupo experimental.....	104
Figura 23	Médias das quantidades de fibras musculares nos grupos controle e experimental	106
Figura 24	Imuno-histoquímica para detecção de NFκB em cortes de músculo bíceps femoral do grupo controle.....	108
Figura 25	Imunohistoquímica para detecção de NFκB em cortes do músculo bíceps femoral do grupo experimental	109
Figura 26	Porcentagem de marcação positiva com o NFκB nos dois grupos estudados, controle e experimental	110
Figura 27	Imunohistoquímica para detecção de TGF-β1 em cortes do músculo bíceps femoral do grupo controle	111
Figura 28	Imunohistoquímica para detecção de TGF-β1 em cortes do músculo bíceps femoral do grupo experimental	113
Figura 29	Porcentagem de marcação positiva com o TGF-β nos dois grupos estudados, controle e experimental	114
Figura 30	Imunohistoquímica para detecção de distrofina em cortes do músculo bíceps femoral dos grupos controle e experimental	115
Figura 31	Expressão dos genes distrofina, miostatina, utrofina, TGF-beta, TNF-alfa e VEGF, no grupo controle e animal experimental E1	117
Figura 32	Expressão dos genes distrofina, miostatina, utrofina, TGF-beta, TNF-alfa e VEGF, no grupo controle e animal experimental E2	118
Figura 33	Expressão dos genes distrofina, miostatina, utrofina, TGF-beta, TNF-alfa e VEGF, no grupo controle e animal experimental E4	119

Figura 34	Expressão dos genes: distrofina, miostatina, utrofina, TGF-beta, TNF-alfa e VEGF, no grupo controle e experimental	120
-----------	--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de leucócitos (mm^3) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)	79
Tabela 2	Valores de hematócrito (%) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)	81
Tabela 3	Valores de plaquetas (mil) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012).....	83
Tabela 4	Valores de uréia (mg/dL) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)	84
Tabela 5	Valores de creatinina (mg/dL) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012).....	86
Tabela 6	Valores de TGP (U/L) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)	87
Tabela 7	Valores de fosfatase alcalina (U/L) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012).....	89
Tabela 8	Valores de creatinina quinase (U/L) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012).....	91
Tabela 9	Valores de albumina (g/dL) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)	93
Tabela 10	Valores de proteína total (g/dL) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)	94

Tabela 11	Valores hematológicos e bioquímicos da média encontrada nos grupos controle e experimental (São Paulo, 2012)	96
Tabela 12	As médias da morfometria nos animais dos dois grupos, controle e experimental, nos diferentes tempos (São Paulo, 2012)	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Terapias medicamentosas em modelos de estudo para Distrofia Muscular de Duchenne. São Paulo, 2012	35
Quadro 2	Identificação dos animais experimentais e controles (São Paulo, 2012)	61
Quadro 3	Posologia utilizada para coquetel medicamentoso (São Paulo, 2012)	62
Quadro 4	Anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica (São Paulo, 2012)	66
Quadro 5	Animais e momentos de coleta. (São Paulo, 2012)	67
Quadro 6	Sequências dos oligonucleotídeos de cão utilizados para a quantificação da expressão gênica em tecidos musculares. (São Paulo, 2012)	70
Quadro 7	Concentrações de primers selecionadas para utilização nas reações de qRT- PCR. (São Paulo, 2012).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina (do inglês <i>adenosin triphosphate</i>)
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FA	Fosfatase alcalina
GRMD	Distrofia muscular do cão Golden Retriever (do inglês <i>Golden Retriever muscular dystrophy</i>)
HE	Hematoxilina-eosina
Mdx	Camundongo com distrofia muscular ligado ao cromossomo x (do inglês <i>x-linked muscular dystrophy mice</i>)
NF- κ B	Fator nuclear kappa B (do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>)
nNox	Óxido nítrico sintetase neuronal (do inglês <i>neuronal nitric oxide synthase</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
SRD	Sem raça definida
T0	Tempo 0 = momento de coleta antes do início do tratamento
Tt	Tempo tratamento = momento de coleta durante o período experimental
Tf	Tempo final = momento de coleta após o término do experimento
TBST	Solução salina tris e Tween 20 (do inglês <i>tris buffered saline and tween</i>)
TGF- β 1	Fator transformador de crescimento betta 1 (do inglês <i>transformin growth factor betta 1</i>)
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 HIPÓTESE	29
4 REVISÃO DE LITERATURA	31
4.1 Distrofia Muscular	31
4.2 Modelo Animal	36
4.3 Medicamentos	37
4.3.1 Sildenafil	38
4.3.2 Ácido Ursodesoxicólico	39
4.3.3 Acetilcisteína	40
4.3.4 Losartana Potássica	41
4.3.5 Micofenolato de Mofetila	44
4.3.6 Talidomida	45
4.3.7 Diltiazem	45
4.4 Distrofina	49
4.5 TNF α	51
4.6 Miostatina	52
4.7 TGF β	53
4.8 NF-KAPPA β	54
4.9 Utrofina	55
4.10 VEGF	56
5 MATERIAL E MÉTODO	59
5.1 Animais	59
5.2 Grupos Experimentais	60
5.3 Medicamentos	61
5.4 Hemograma e Bioquímica Sérica	62
5.5 Biópsia Muscular	63
5.6 Procedimento Histológico	63
5.6.1 Hematoxilina-Eosina	64
5.6.2 Tricoma de Masson	64
5.7 Morfometria das Células Musculares	65
5.8 Imuno-histoquímica	65
5.9 PCR em tempo real para análise da expressão gênica para os genes miostatina, utrofina, TGF- β , TNF- α , distrofina e VEGF	67
5.9.1 Extração de RNA total	68
5.9.2 Síntese de cDNA fita dupla	68
6 RESULTADOS	75
6.1 Animais “piloto”	75
6.2 PCR para a seleção dos animais experimentais	76
6.3 Grupos Experimentais	76
6.4 Hemograma e Bioquímica Sérica	78
6.5 Análise histopatológica	97

6.5.1 Coloração Hematoxilina Eosina	97
6.5.2 Coloração de Tricoma de Masson.....	101
6.6 MORFOMETRIA DAS CÉLULAS MUSCULARES	105
6.7 IMUNOHISTOQUÍMICA	106
6.7.1 NFκβ	107
6.7.2 TGF-β 1	110
6.7.3 Distrofina.....	114
6.8 qRT PCR.....	116
7 DISCUSSÃO	122
8 CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS	135

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne é uma doença degenerativa causada por mutação no gene codificante da distrofina (LOMBARD, 2011), afeta crianças do sexo masculino e é causada pela ausência da proteína distrofina. É geneticamente homóloga à distrofia muscular em cães da raça Golden Retriever (GRMD), isso justifica o uso dos cães em modelos experimentais para diversos estudos que visam à busca de tratamentos para os meninos vitimados pela doença.

A proteína distrofina está associada ao sarcolema dos músculos lisos, cardíacos e esquelético, que ajuda a manter a integridade da membrana durante o processo de contração muscular. Esta proteína é codificada por um enorme gene localizado no cromossomo X, sendo, portanto, mais susceptível a mutações. Sendo assim, a deficiência da distrofina afeta predominantemente o sexo masculino, pelo fato das pessoas deste sexo possuir apenas um cromossomo X (BERGMAN et al, 2002). As crianças afetadas apresentam fraquezas progressivas devido à perda da massa muscular e as contraturas. A lesão da miofibrila sem uma total recuperação tanto nas crianças quanto no modelo canino GRMD, resultam em fibroses, contraturas e fraqueza muscular (CHILDERS et al, 2002).

Diversas terapias são testadas, tanto nos modelos animais, quanto no humano e entre elas estão, o tratamento com corticóides (CAMPBELL; JACOB, 2003), injeções de gentamicina (WAGNER et al, 2001), análogos da coenzima Q10 (RUSTIN et al, 1999), injeções de oligonucleotídeos (VAN DEUTEKOM et al, 2007), uso de bortezomibe (ARAUJO, 2009), entre outras.

Não existe até o momento uma terapia efetiva para bloquear ou reverter o processo da distrofia muscular. Embora a terapia gênica e o transplante de células tronco possam fornecer a cura para a DMD, resultados positivos podem demorar algum tempo até serem clinicamente viáveis. Neste sentido, a busca de terapias paralelas e medicamentosas que possam melhorar a condição vital do paciente, por retardo da progressão dos sinais clínicos, é de grande importância, uma vez que melhorariam a qualidade de vida dos mesmos (COHN et al, 2007).

Uma equipe multidisciplinar brasileira (Projeto GRMD Brasil) avalia as possibilidades de melhoria na qualidade de vida desses animais, tendo por objetivo final, testes de novos medicamentos, terapias celulares, gênicas, entre outros, para que um dia esses experimentos sirvam como uma forma terapêutica para o ser humano.

Neste trabalho, idealizamos um coquetel de fármacos que pudessem agir na fibra muscular e retardar a sua degeneração. Foram selecionados sete diferentes medicamentos, Sildenafil; Ácido ursodesoxicólico; Acetilcisteína; Losartana Potássica; Micofenolato de Mofetila; Talidomida; Diltiazem. Cada um deles tem a função de melhorar alguns eventos deletérios causado pela distrofia muscular, entre elas, aumento do óxido nítrico, antioxidante, antiinflamatório, cardioprotetor, citoprotetor, imunomodulador, anti-fibrótico e bloqueador dos canais de cálcio. Com esses medicamentos, não sugerimos a cura imediata, mas sim o aumento de qualidade de vida do paciente distrófico.

Existem alguns parâmetros que foram avaliados além da melhora clínica desses animais. Entre eles, estão parâmetros hematológicos e bioquímicos, além dos cortes de fragmentos de músculos para técnicas de coloração. Estes objetivam evidenciar a estrutura muscular com deposição de tecido conjuntivo, as técnicas de imunohistoquímica e PCR colocar em evidência a expressão e/ou quantificação de marcadores como a distrofina, miostatina, TGF- β , TNF- α , NF κ B e VEGF.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram divididos em objetivos gerais e específicos conforme citado abaixo.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do coquetel de medicamentos: Sildenafil, Acido ursodesoxicólico, Acetilcisteína, Losartana Potássica, Micofenolato de Mofetila, Talidomida e Diltiazem no músculo esquelético do modelo GRMD. Pois os efeitos nocivos da doença causam uma série de eventos que podem ser minimizados, quando fornecemos uma terapia direcionada a cada um deles.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar possíveis efeitos adversos em fígado e rins, por meio de exames séricos, função hepática e renal, avaliando a viabilidade do uso dos medicamentos nos cães afetados pela distrofia muscular.
- Identificar por meio da imuno-histoquímica e do PCR, a presença de TGF- β 1, NF κ - β , TNF- α , distrofina e miostatina no músculo esquelético de cada animal antes, durante e após o tratamento, comparando entre eles e também com o controle. Avaliar se os medicamentos tiveram efeito sobre a musculatura esquelética desses animais.
- Avaliar se houve formação de fibrose muscular.

- Acompanhar a evolução das alterações primárias e secundárias à distrofia, por meio de parâmetros hematológicos e bioquímicos.
- Avaliar se houve melhora na qualidade de vida desses animais.

3 Hipótese

3 HIPÓTESE

A administração dos fármacos, Sildenafil, Ácido ursodesoxicólico, Diltiazem, Losartana Potássica, Acetilcisteína, Talidomida e Micofenolato de Mofetila, poderão promover o relaxamento muscular por aumento do óxido nítrico, inibir a apoptose e por consequência diminuir a fibrose tecidual, diminuir o cálcio intracelular, diminuir o TGF- β e consequentemente diminuição da fibrose muscular, ação anti-inflamatória, bloquear o TNF e consequentemente diminuir a resposta inflamatória, além de causar a imunossupressão da população linfocitária diminuindo consequentemente a inflamação muscular.

4 Revisão de Literatura

4 REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar a leitura, dividimos a revisão de literatura em tópicos, da seguinte forma: 4.1 Distrofia muscular; 4.2 Modelo animal; 4.3 Medicamentos; 4.4 Distrofina; 4.5 TNF α ; 4.6 Miostatina; 4.7 TGF β ; 4.8 NF κ β ; 4.9 VEGF

4.1 DISTROFIA MUSCULAR

Distrofia muscular é um termo amplamente utilizado para se referir a qualquer doença de ordem primária da musculatura esquelética, que resulta em degeneração progressiva, regeneração limitada e fibrose de miofibrilas (BERGMAN et al, 2002). A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a forma mais grave, comum e de evolução mais rápida entre as miopatias hereditárias. Teve seu primeiro gene identificado em 1986 e recebe esse nome em alusão ao neurologista francês que forneceu a primeira descrição completa da patologia, em 1868 (JORDE, 2004).

A Distrofia Muscular de Duchenne constitui um distúrbio genético, de caráter recessivo, com alta taxa de mutação em um gene localizado no braço curto do cromossomo X, numa região denominada Xp21 (Figura 1). O gene tem tamanho grande e estudos tem identificado que uma parte dele que é funcionalmente capaz de produzir distrofina. As mutações em outras proteínas do complexo de glicoproteína da distrofina são responsáveis pelas formas autossômicas recessivas de distrofias musculares similares à Duchenne, como a distrofia muscular da cintura dos membros e outras distrofias. As distrofias musculares são um grupo de distúrbios musculares hereditários que provocam fraqueza muscular de gravidade variável. Outros distúrbios musculares hereditários incluem as miopatias miotônicas, as doenças de depósito de glicogênio e a paralisia periódica (CAROMANO, 1999; YIU; KORNBERG, 2008).

Figura 1 - Heredograma da DMD

	X	X*	
X	XX 25%	X*X 25%	
Y	XY 25%	X*Y 25%

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

Legenda: X é considerado cromossomo feminino sadio; X* cromossomo feminino carreador da mutação genética; Y cromossomo masculino, na doença DMD, sempre sadio.

Apresenta como sinais clínicos a perda progressiva da força muscular, resultando em fraqueza dos músculos respiratórios e cardíacos, sendo que a grande maioria dos pacientes desenvolvem cardiomiopatia. Ocorre, principalmente, em pessoas do sexo masculino, sendo que as mulheres são portadoras. Sua incidência é de cerca de um para cada 3500 nascidos vivos do sexo masculino. No Brasil, ocorrem por ano, cerca de 700 novos casos de DMD (CAROMANO, 1999).

A distrofina é o maior componente do complexo distrofina - glicoproteínas (DGC), no qual liga o citoesqueleto da miofibrila com a matrix extracelular. A ruptura desse complexo causa um aumento da susceptibilidade de lesão induzida pela contração, e lesão do sarcolema, ocasionando necrose da miofibrila, levando à perda progressiva da massa e função muscular (PASTORET, 1995; COULTON, 1988; TANABE; ESAKI; NOMURA, 1986) (Figura 2).

Figura 2: Complexo distrofina-glicoproteínas

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Legenda: A proteína distrofina desempenha papel de ligação entre a actina e o complexo glicoproteico, fornecendo estabilidade ao sarcolema.

Segundo Valentine, Blue e Cooper (1989), o músculo sem a proteína distrofina, fica mais susceptível a lesões induzidas pelo exercício, evidenciada pelo rápido influxo de enzimas musculares. Pelo fato desse complexo proteico estar inserido no sarcolema e de fornecer a ligação entre o citoesqueleto interno da célula muscular e a matrix extracelular, a perda desta proteína destrói essa ligação e então gera a degeneração muscular (DAVIES, 1997).

O músculo distrófico apresenta variações no tamanho da fibra muscular e acúmulo de núcleos centrais, infiltração de tecido conectivo e adiposo e elevado nível de creatinoquinase no plasma. O estágio inicial da doença é caracterizado pela presença de grupos focais de miofibras necróticas e hipertrofia muscular. Na fase patológica, repetidos ciclos de degeneração desgasta a capacidade de regeneração das células satélites, e estão associadas com repetidos ciclos de inflamação e fibrose significativa,

no qual afeta os músculos de forma geral, podendo levar a uma parada cardiorrespiratória (DECONINCK; DAN, 2007).

Quanto ao tratamento de manutenção, principalmente de fisioterapia, a literatura científica, ainda que escassa, recomenda diferentes programas de exercícios para as distrofias musculares e, aquelas encontradas, sugerem um efeito benéfico da atividade física para a DMD, principalmente naqueles com alterações mínimas da função muscular (DEMOS, 1983; RIDEAU, 1985; VIGNOS et al, 1996; ANSVED, 2003).

Numa distrofia, as fibras musculares são frágeis devido a anormalidades genéticas em proteínas que dão suporte estrutural ao sarcolema. Em consequência, as fibras sofrem rupturas do sarcolema e, portanto, necrose, já com o uso normal do músculo. As fibras necróticas têm capacidade de regenerar-se. Contudo, vários ciclos de necrose e regeneração induzem fibrose entre elas, tanto no perimísio como no endomísio. Ao fim de alguns anos a regeneração eficiente vai diminuindo e o músculo gradualmente é substituído por tecido fibroso e adiposo. Na DMD isto geralmente leva à morte em torno de 20 anos por insuficiência respiratória. Além da fibrose, nota-se irregularidade no diâmetro das fibras musculares, havendo fibras desde atroficas até hipertróficas. As atroficas são provavelmente fibras cuja regeneração não foi bem sucedida ou que ficaram desnervadas. As hipertróficas estão 'tentando compensar' a falta das demais (hipertrofia vicariante) (PALMIERI; SBLENDORIO, 2006).

O diagnóstico de DMD pode ser estabelecido na maioria dos casos, através da história familiar, de achados clínicos, laboratoriais e genéticos (análise de DNA). Os níveis enzimáticos, principalmente de creatinoquinase (CK), biópsia muscular e análise de DNA são amplamente explorados na caracterização da doença (CAROMANO, 1999).

A dosagem da CK é de extrema importância, uma vez que também servirá de indicação no diagnóstico diferencial entre as formas de distrofias musculares progressivas. Na DMD, os autores colocam que os níveis CK estão aumentados de 100 a 300 vezes na fase pré-clínica. Através de *Western blot* também se pode diagnosticar a DMD ao detectar menos de 3% de distrofina no músculo, associada à diminuição de α -sarcoglicanas (ERAZO-TORRICELLI, 2004).

Há inúmeras terapias medicamentosas sendo testadas, como mostra o quadro 1, o qual não mostra as diversas terapias celular e gênica. É visível que os estudos são mais focados em terapias apenas com um medicamento e em modelo murino, o *mdx*. No entanto, até o momento não existe uma terapia eficaz no intuito de reverter ou atenuar o processo da distrofia muscular (COHN et al, 2007).

Quadro 1: Terapias medicamentosas em modelos de estudo para Distrofia Muscular de Duchenne (São Paulo, 2012)

TERAPIA	MODELO	REFERÊNCIA
Corticoterapia com fisioterapia respiratória	Humano	Machado, 2010
Uso de Bortezomibe	GRMD	Araújo, 2009
Uso de Losartana Potássica	GRMD	Silva, 2009
Uso de ciclosporina	GRMD	Morini,
Metilprednisona x aspirina, ibuprofeno	<i>mdx</i>	Serra, et al, 2012
Acetilcisteína	<i>mdx</i>	De Senzi Mordos Pinto et al; Terrill et al 2012
Sildenafil	<i>mdx</i>	Percival, et al, 2012; Adamo, et al, 2010
Enalapril	<i>mdx</i>	Cozzoli, et al, 2011
Bradiquinina	GRMD	Dabiré, et al, 2012
Chá verde (galato de epigallocatequina)	<i>mdx</i>	Nakae, et al, 2012
Lisinopril e espironolactona	<i>mdx</i>	Rafael-Fortney, 2011
Losartana	<i>mdx</i>	Bish, et al, 2011
PEGylated insulin like	<i>mdx</i>	Gehrig., et al, 2012.
Ursacol	<i>mdx</i>	Miles et al, 2011 Siegal et al, 2011
Diltiazem	<i>mdx</i> <i>homem</i>	Matsumura et al, 2009 Iwata et al, 2005 Phillips; Quinlivan, 2008

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

4.2 MODELO ANIMAL

Embora o camundongo com a mutação do cromossomo X (*mdx*) seja o modelo animal mais utilizado em estudos da patogênese e dos efeitos da terapia gênica e transplante celular, a lenta progressão da doença nesse modelo o torna clinicamente pouco viável para se transpor resultados para humanos portadores de DMD. O quadro clínico do *mdx* é mantido relativamente normal, já que apresenta uma menor degeneração das fibras musculares, maior regeneração e menos fibrose do que encontrado nos pacientes com DMD (PASTORET; SEBILLE, 1995; SHELTON, 2004).

O modelo canino GRMD é o modelo animal mais similar a DMD humana. Por ser geneticamente homólogo, compartilha seu quadro de miopatia severa e desenvolvimento clínico letal. Em ambas as doenças, a necrose e regeneração começam cedo no músculo esquelético e estão associados com a proliferação do tecido conjuntivo (COOPER et al, 1988; VALENTINE et al, 1988; VALENTINE et al, 1990).

Mutações espontâneas do gene da distrofina, resultando na distrofia muscular ligada ao cromossomo X têm sido identificadas em diversas raças de cães domésticos: o Golden Retriever, o Rottweiler, Beagle, entre outros. Destes, o GRMD tem sido o modelo animal mais amplamente estudado e o melhor caracterizado. Em 1958, Méier documentou o primeiro caso de cão com distrofia em um filhote de *Golden Retriever*. Desde as primeiras descrições, a mutação do gene da distrofina no GRMD tem sido identificada e então, este modelo animal tem sido reconhecido e amplamente utilizado nas avaliações experimentais de novos tratamentos previamente aos estudos clínicos em humanos (COLLINS; MORGAN, 2003; SHELTON; ENGVALL, 2004).

O cruzamento de cães GRMD de uma fêmea heterozigota, ou seja, portadora do gene com a distrofia, com um macho afetado gera machos normais, fêmeas heterozigotas e machos e fêmeas afetados (NGUYEN, 2002).

Clinicamente, os cães machos afetados cansam com facilidade, desenvolvem deformidades esqueléticas e marchas alternantes anormais, caracterizadas por passadas rígidas e curtas. Podem ainda, apresentar redução na capacidade de abrir os maxilares e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos; a maior parte da musculatura esquelética torna-se atrofica, porém, certos grupos musculares e a língua

apresentam-se com hipertrofia (NGUYEN et al, 2002). Esta hipertrofia está associada com a disfunção da faringe e do esôfago resultando em disfagia, sialorréia e regurgitação. A função respiratória está diminuída e caracterizada pelo o aumento da frequência respiratória de repouso e um excessivo componente abdominal respiratório após mínimos esforços (SHELTON, 2005).

A patogênese do GRMD se manifesta intra-útero e pode ser identificado a partir do nascimento, com importantes sinais de necrose dos músculos dos membros, pescoço e tronco que progridem conforme o animal alcança a maturidade (COLLINS; MORGAN, 2003). Os sinais clínicos progridem rapidamente entre os três e seis meses de idade (KORNEGAY et al, 1994). O estágio inicial da doença é caracterizado pela presença de grupos focais de miofibrilas necrosadas, hipertrofia muscular e altos níveis anormais de CK. Em uma segunda fase (patológica), repetidos ciclos de degeneração diminuem a capacidade de regeneração das células satélites e mecanismos fibróticos causam o progressivo depósito de tecido fibroso e colagenoso.

Em humanos, este processo ocasiona contraturas articulares, perda da marcha entre 10-12 anos de idade, e na maioria das vezes, assim como ocorre com os seres humanos, os cães distróficos morrem por falência respiratória e/ou cardíaca, embora alguns alcancem a idade adulta (COLLINS; MORGAN, 2003).

Muitos grupos utilizam o *mdx*, por ser de mais fácil manejo e menor custo, e alguns desses grupos, após bons resultados com *mdx*, financiam projeto em um canil GRMD, este presente trabalho, inicia seu experimento em cães GRMD, por ser o modelo mais confiável para estudo da doença.

4.3 MEDICAMENTOS

Para a formulação de um coquetel de medicamentos, sete foram escolhidos, e estão descritos a seguir.

4.3.1 Sildenafil

A Sildenafil é popularmente comercializada como Viagra®. A descoberta do citrato de sildenafil representou um grande avanço no tratamento da disfunção erétil, podendo beneficiar, entre muitos outros, os portadores de doença cardiovascular ou com seus fatores de risco (GUIMARAES et al, 1999).

Sildenafil pertence classe de agentes inibidores das fosfodiesterases. A ação erétil do Sildenafil combina o aumento do influxo arterial com a redução do efluxo venoso do corpo cavernoso. O Sildenafil leva ao relaxamento da musculatura lisa das artérias penianas e das trabéculas que circundam os espaços sinusoidais, acarretando maior ingurgitamento do corpo cavernoso. As trabéculas dos espaços sinusoidais ingurgitados comprimem, por sua vez, as vênulas penianas contra a túnica albugínea, reduzindo o efluxo venoso, contribuindo para a manutenção do ingurgitamento do corpo cavernoso (BOOLELL et al, 1996). O relaxamento dessa musculatura lisa resulta da diminuição do cálcio intracelular mediada pelo acúmulo do segundo mensageiro, o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), cuja produção decorre da ativação da guanil-ciclase pelo óxido nítrico produzido pelo estímulo das células endoteliais, gerado pelo desejo sexual. O fator limitante deste processo é a degradação do GMPc pela enzima fosfodiesterase 5 (PDE5), presente em altas concentrações nessas estruturas penianas. O Sildenafil facilita a ereção por sua elevada especificidade e potência como inibidor dessa fosfodiesterase (RAJFER et al, 1992; TURKO, FRANCIS, CORBIN, 1998).

Atuando na fase final do ciclo bioquímico da ereção, a ação do Sildenafil depende do desejo sexual, não sendo, portanto, um afrodisíaco. Concentrações menos elevadas da PDE5 podem ser encontradas também na musculatura lisa das artérias em geral, das vísceras e da traquéia, e nas plaquetas. Já foram identificados sete tipos de fosfodiesterase (PDE). O Sildenafil tem menor poder inibitório sobre outras isoenzimas da fosfodiesterase em comparação com a PDE5. Tem fraca seletividade (1.000 vezes menor) para a PDE2 (predominante na córtex adrenal), PDE3 (musculatura lisa, plaquetas e miocárdio) e PDE4 (linfócitos do cérebro e pulmões); moderada seletividade (80 ou mais vezes menor) para a PDE1 (predominante no cérebro, rins e

músculo liso) e seletividade apenas 10 vezes menor para a PDE6 (fotorreceptores da retina), provável causa dos distúrbios visuais que podem ocorrer com o uso do sildenafil. A seletividade 4.000 vezes menor para a PDE3 (envolvida na contratilidade miocárdica) é importante porque inibidores desta isoenzima (milrinona, vesnarinone e enoximone), usados no tratamento da insuficiência cardíaca provocam arritmia cardíaca e outros efeitos adversos (BOOLELL et al, 1996; TURKO; FRANCIS; CORBIN, 1998).

Como o Sildenafil aumenta os níveis de GMPc (um sinalizador do relaxamento muscular cardíaco), ocorre relaxamento muscular, auxiliando no tratamento de cardiomiopatias. Sildenafil melhorou a função cardíaca em camundongos afetados pela distrofia (*mdx*). A utilização do Sildenafil mostrou ser capaz de aumentar a concentração de GMPc, impedindo sua destruição (KHAIRALLAH, M., 2008).

Percival et al (2012) avaliou o músculo diafragma de camundongos *mdx* durante 14 semanas de tratamento, usando o Sildenafil, e observaram uma redução significativa na fraqueza do músculo diafragmático, sem afetar a resistência a fadiga. Observaram também uma melhor contratilidade muscular respiratória, com organização de matriz extracelular normal. Houve uma desaceleração de fibrose no diafragma. O Sildenafil neste trabalho, também normalizou a expressão de TNF-alfa.

Ascah et al (2011) estudou o coração de *mdx* jovens, antes de uma lesão cardíaca, e concluiu que o existe uma precoce abertura das mitocôndrias, antes mesmo de uma lesão e então avaliou o efeito cardíaco do Sildenafil em *mdx*. Demonstram que o uso do Sildenafil diminui o influxo de cálcio para as células, e diminui também a absorção mitocondrial de cálcio.

Estudo feito por Lorenzetti (2007) utilizou dosagem de 10 mg/kg, via oral, em cães da raça Beagle, sem efeitos adversos aparentes.

4.3.2 Ácido Ursodesoxicólico

A farmacocinética do Ácido Ursodesoxicólico tem sido bem estudada em cães, humanos e roedores. É absorvido de forma passiva, primariamente no intestino

delgado. A absorção é aumentada na presença de alimento (WEBSTER; COOPER, 2009). Não foi notado efeitos adversos em cães e gatos com doses de 10 – 15 mg/kg/dia, em tratamentos por 2 – 3 meses (NICHOLSON et al, 1996).

O Ácido Ursodesoxicólico é utilizado para a dissolução de cálculos biliares de colesterol. A solubilidade do colesterol na bile é determinada pelas proporções relativas de ácido biliares, lecitina e colesterol. Os principais efeitos aparentes são: 1. Efeito estabilizante da membrana hepatocitária; 2. Melhora da secreção biliar; 3. Efeito modulador sobre a reação inflamatória (KATZUNG, 2006). E ainda, efeitos anti-apoptóticos, ação imunomoduladora e estabilidade da função mitocondrial (BEUERS, 2006; PAUMGARTNER, 2006). Os efeitos citoprotetores do Ácido Ursodesoxicólico, não estão limitados às células hepatobiliares, tem efeito também nos miócitos cardíacos, células neuronais e células do epitélio gastrointestinal (BERNARDES-SILVA et al, 2004; RIVARD et al, 2007; RAMALHO et al, 2008).

A maior ação citoprotetora do Ácido Ursodesoxicólico é a habilidade de inibir a apoptose. O Ácido Ursodesoxicólico, por modular a apoptose, preserva a integridade mitocondrial (BEUERS, 2006; RAMALHO et al, 2008).

Embora não haja trabalhos com esse medicamento no estudo da doença, visamos testá-lo pelo fato de ter efeito sobre a reação inflamatória, e então efeito nas células musculares, diminuindo a inflamação, e automaticamente, a fibrose tecidual.

4.3.3 Acetilcisteína

A Acetilcisteína exerce intensa ação mucolítico-fluidificante das secreções mucosas e mucopurulentas, despolimerizando os complexos mucoproteicos e os ácidos nucleicos que dão viscosidade ao escarro e a outras secreções, além de melhorar a depuração mucociliar. Além disso, a Acetilcisteína exerce ação antioxidante direta, sendo dotada de um grupo tiol livre (-SH) nucleofílico em condições de interagir diretamente com os grupos eletrofílicos dos radicais oxidantes. De particular interesse é a recente demonstração de que a Acetilcisteína protege a alfa-1-antitripsina, enzima

inibidora da elastase, de ser inativada pelo ácido hipocloroso (HClO), potente agente oxidante que é produzido pela enzima mieloperoxidase dos fagócitos ativados. A estrutura da sua molécula permite-lhe, além disso, atravessar facilmente as membranas celulares. No interior da célula, a Acetilcisteína é desacetilada, ficando assim disponível a L-cisteína, aminoácido indispensável para a síntese da glutathione (GSH). A GSH é um tripeptídeo extremamente reativo que se encontra difundido por igual nos diversos tecidos dos organismos animais e é essencial para a manutenção da capacidade funcional e da integridade da morfologia celular, pois é o mecanismo mais importante de defesa intracelular contra os radicais oxidantes (tantos exógenos como endógenos) e contra numerosas substâncias citotóxicas (STEPHAN, 1980).

N-Acetilcisteína (NAC) é uma formulação estável do aminoácido L-cisteína, que reabastece a cisteína intracelular e com isso, aumenta os níveis de glutathione (GSH). A NAC é bem conhecida como antídoto para o paracetamol induzindo a toxicidade das hemácias e hepatócitos. NAC também tem uma infinidade de outros efeitos citoprotetores, incluindo um efeito sobre o tônus vascular que pode melhorar o fornecimento de oxigênio, capacidade de aumentar metabolismo energético mitocondrial e ações anti-inflamatórias. (ZAFARULLAH et al, 2003).

A dose letal de Acetilcisteína quando administrada por via oral em cães é de mais de 1000mg/kg (WEBSTER; COOPER, 2009).

A escolha dessa droga é pela sua característica antioxidante, visando melhorar o estado fisiológico da célula muscular e assim, amenizar os efeitos decorrentes da distrofia.

4.3.4 Losartana Potássica

Losartana Potássica é uma potente droga anti-hipertensiva, inibidora dos receptores AT1 da angiotensina II, sendo que seu uso vem sendo sugerido promissoriamente como opção terapêutica no tratamento de doenças musculares progressivas.

A Losartana é um antagonista potente e específico dos receptores AT1 da angiotensina, ativos por via oral. A eficácia desses fármacos na hipertensão assemelha-se a dos inibidores de ECA, porém estão associados a uma menor incidência de tosse. A exemplo de inibidores da ECA, os antagonistas não-peptídicos da angiotensina II retardam a progressão da nefropatia diabética. Os antagonistas também mostram-se efetivos no tratamento da insuficiência cardíaca e proporcionam uma alternativa útil quando os inibidores da ECA não são bem tolerados. A exemplo dos inibidores da ECA, esses fármacos são bem tolerados, porém não devem ser administrados a pacientes com doença renal não-diabética, nem durante a gravidez.

Os antagonistas atuais dos receptores de angiotensina II são seletivos para o receptor AT1. Como o tratamento prolongado com esses fármacos libera a inibição da secreção de renina aumentando os níveis circulantes de angiotensina II, pode ocorrer aumento da estimulação dos receptores AT2. Esse aspecto pode ser significativo, considerando-se as evidências de que a ativação do receptor AT2 provoca vasodilatação e outros efeitos benéficos. Dispõe-se de antagonistas dos receptores AT2, como o PD123177, para pesquisa, porém esses agentes não tem nenhuma aplicação clínica no momento.

Os benefícios clínicos dos antagonistas dos receptores AT1 assemelham-se aos dos inibidores da ECA, e ainda não está bem definida se um grupo de fármacos possui vantagens significativas em relação ao outro. A terapia de combinação com um inibidor da ECA e um antagonista dos receptores de angiotensina tem diversas vantagens potenciais e no momento atual, está sendo investigado. (KATZUNG, 2007)

Figura 3: Mecanismo de ação da Losartana

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

Bloqueio do receptor de angiotensina tipo 2, atenua a indução de TGF-beta, atuando na regeneração muscular em vários estágios miopáticos (SILVA, 2009).

Observou-se atenuação da distrofia nos músculos gastrocnêmio e diafragma de *mdx*. Os animais tratados mostraram-se mais resistentes a fadiga e houve aumento das fibras musculares, comprovado por um aumento da área muscular. Esse tratamento não visa curar distrofias, mas agir como coadjuvante, fortalecendo a musculatura e retardando aparecimento de reações das distrofias. O TGF- β é uma proteína muscular que pode contribuir para o aparecimento da fibrose e agravar as doenças musculares. São necessários tratamentos que reduzam a ação da TGF- β para reduzir as fibroses das distrofias musculares. As fibroses resultam do excesso de deposição do tecido conjuntivo, fator de incapacitação das funções musculares (COHN et al, 2007).

Wagner et al (2002) mostraram que a reposição por tecido fibrótico e gorduroso em diafragma de camundongo *mdx*, como resultado de repetidos ciclos de

degeneração e diminuição de regeneração muscular, parece ser atenuado na falta da miostatina (membro da família do TGF- β). Estes achados, mais uma vez, confirmam que a regeneração muscular pode ser relacionada com a inibição da atividade do TGF- β , cuja proposta está sendo elaborada com o uso do Losartan. Baseado nestes estudos, visamos realizar testes com esse medicamento, com o objetivo de analisar seu efeito regenerativo nos animais GRMD.

Estudo feito por Silva (2009) demonstrou dose eficaz, sem efeitos adversos aparentes, de 3,5 mg/kg duas vezes ao dia da Losartana Potássica, em estudo com 4 cães afetados pela distrofia muscular progressiva.

4.3.5 Micofenolato de Mofetila

Micofenolato de Mofetila (MMF) é um potente inibidor de uma enzima chamada inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH). Quando metabolizado é convertido em ácido micofenólico (PAPICH, 2009).

O MMF inibe uma série de respostas dos linfócitos T e B. Sua ação envolve a inibição da síntese de purinas. O MMF é hidrolisado a ácido micofenólico, o componente imunossupressor ativo; é sintetizado e administrado na forma de Micofenolato de Mofetila para aumentar sua biodisponibilidade (KATZUNG, 2006).

Este medicamento, um imunossupressor, tem a finalidade de atenuar os efeitos deletérios dos linfócitos ativos, consequentemente, atuando a inflamação tecidual.

Estudos realizados por Lee et al (2010), demonstraram que a dose eficaz para o uso de Micofenolato de Mofetila, é de 10mg/kg, por via oral, duas vezes ao dia.

4.3.6 Talidomida

Células com injúrias liberam proteínas que aumentam o fluxo sanguíneo, entre elas, o TNF-alfa. A Talidomida pode bloquear a produção do TNF-alfa, reduzindo inflamações. Estudos demonstram a capacidade da Talidomida na inibição da produção do fator de necrose tumoral (TNF-alfa), um potente estimulador da inflamação. Essa citocina é importante nos processos inflamatórios e imunológicos, estudos vem sendo realizados para estudar a interação da Talidomida com diferentes linhagens de células do sistema imunológico, retículo endotelial e nervoso.

A Talidomida tem propriedades antiinflamatórias, imunossupressoras, anti-angiogênicas e antivirais.

Essa droga pode regular a resposta imune e induzir uma tolerância imunológica. Tem atividade imunossupressora e antiinflamatória (MELCHERT; LIST, 2007).

Teo et al (2000), estudou a Talidomida em 56 cães beagles, por 53 semanas, com doses de 12, 100, 1000 e 2000mg/kg, a dose que se assemelha com o humano é de 43 mg/kg, e nas doses até maiores que 1000mg/kg, não foi observado toxicidade. Vários parâmetros, como mensurações corpóreas, histologias, urinálise, hematologia, bioquímica sérica, observações clínicas e consumo de alimentos, foram analisados, e somente houve alteração na coloração da urina em doses superiores a 100mg/kg e uma discreta diminuição nos níveis séricos de glicose.

4.3.7 Diltiazem

Os bloqueadores dos canais de cálcio (BCC) constituem uma classe de drogas estruturalmente heterogênea. Apesar de todos os agentes dessa classe bloquearem os canais de cálcio, os componentes de cada subclasse ligam-se a um único local do canal. Eles são classificados em derivados dihidropiridínicos e não-dihidropiridínicos. O Diltiazem (um benzodiazepínico) representa um não-dihidropiridínico. O grupo das

dihidropiridinas (DHP), tendo como protótipo a nifedipina, inclui grande número de agentes mais novos como a nitrendipina, nicardipina, nisoldipina, anlodipino, felodipina, lacidipina e lercanidipino. A heterogeneidade estrutural levou à heterogeneidade funcional, principalmente em relação à potência vasodilatadora e efeitos inotrópico, cronotrópico e dromotrópico no coração. Os BCC de curta duração provocam ativação neurohormonal reflexa do sistema nervoso simpático, caracterizada por taquicardia, aumento do débito cardíaco e aumento da concentração plasmática de catecolaminas e da atividade plasmática da renina.

Os BCC de primeira geração (Diltiazem, nifedipina e verapamil) que são de curta duração tem meia-vida de 1,5 a 7 horas e são administrados cada seis a oito horas.

As DHP diminuem a pressão arterial por diminuir a resistência periférica atuando principalmente em arteríolas, bloqueando os canais de cálcio do tipo L nas células do músculo liso. Adicionalmente, podem modular as funções endoteliais por outro mecanismo, visto que as células endoteliais não expressam canais do tipo L. Alguns estudos mostraram que as DHP aumentam a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) endotelial. Este tem papel fundamental no controle da vasodilatação, aderência leucocitária e agregação plaquetária. Diminuição da liberação do NO tem sido associada à gênese e à progressão de doenças ateroscleróticas. O mecanismo de ação das DHP é responsável pela ativação autonômica reflexa, que pode ser substancial se a DHP tiver efeito de rápida instalação, como a nifedipina de liberação imediata (nifedipina GITS). Com a manutenção da terapia, pode haver diminuição da frequência cardíaca e dos níveis de epinefrina, especialmente com as não-dihidropiridínicas (NIGRO; FORTES, 2005)

Atua como bloqueador dos canais de cálcio. Segundo trabalho de Matsura et al (2008), o Diltiazem, protege as fibras musculares deficientes em distrofia de camundongos *mdx*, inibindo o influxo de cálcio na célula muscular, por bloqueio competitivo com o cálcio. Não causa retenção de sódio e não tem efeito nocivo na função renal.

O uso do Diltiazem foi considerado satisfatório em relação à proteção da fibra muscular, especialmente nos músculos mais degenerados de *mdx*. As fibras

musculares regeneradas apresentaram núcleo centralizado e diâmetro aparentemente normal. Diltiazem também diminui os níveis de CK.

Observou-se uma diminuição da permeabilidade do sarcolema no músculo diafragma dos animais *mdx*. O elevado cálcio intracelular mostra-se um dos responsáveis pela degeneração muscular. A terapia com bloqueadores de canais de cálcio é importante para preservar músculos mais afetados como o diafragma.

Ramirez et al (2003) relatou que a dose eficaz do Diltiazem administrado em cães, via oral, é de 0,5 a 1,5 mg/kg, duas vezes ao dia.

O efeito do coquetel pode ser ilustrado com um esquema da patofisiologia da doença, como mostra a Figura 4.

4.4 DISTROFINA

A distrofina faz parte do complexo glicoprotéico-distrofina (CGD), que liga o citoesqueleto à matriz extracelular de fibras musculares (PORTER et al, 2002). Seu gene é um dos maiores do genoma humano (aproximadamente 2.5 milhões de pares de base, codificado por cerca de 79 exons), localizado no cromossomo X, sendo portanto mais susceptível a mutações (BERGMAN et al, 2002; WALMSLEY, 2010). O gene tem um tamanho característico e estudos tem identificado uma parte dele que é funcionalmente capaz de produzir distrofina (CAROMANO, 1999; YIU & KORNBERG, 2008). A distrofina é um produto desse gene da DMD, localizada na membrana pós-sináptica cortical e nos neurônios de Purkinje. Estes achados sugerem que a distrofina tem um importante papel no cérebro onde deve estar envolvida na função e arquitetura sináptica (BLAKE et al, 1999).

A distrofina é a proteína do citoesqueleto 427- kDa (BLAKE et al, 2002) e é uma grande proteína intracelular que forma a porção central do complexo protéico para a formação da membrana plasmática do músculo (CHILDERS et al, 2002). Faz parte do complexo de transmembrana, que além de manter a estabilidade mecânica do sarcolema, também se localiza em um importante regulador de fluxo sanguíneo no músculo durante o exercício (LOMBARD, 2011). Presente não só na musculatura esquelética, como também no cérebro (TIAN et al, 1997), a distrofina é também o maior componente do complexo distrofina - glicoproteínas (DGC), a qual liga o citoesqueleto da miofibrila com a matrix extracelular. A ruptura desse complexo causa um aumento da susceptibilidade de lesão induzida pela contração, e lesão do sarcolema, ocasionando necrose da miofibrila, levando assim à perda progressiva da massa e função muscular (COULTON, 1988; PASTORET, 1995; TANABE, 1996).

Essa proteína normalmente está localizada na superfície interna da membrana da miofibrila (CHILDERS et al, 2001) e está associada ao sarcolema dos músculos lisos, cardíacos e esqueléticos ajudando a manter a integridade da membrana durante o processo de contração muscular (BERGMAN et al, 2002). Está associada também ao complexo protéico que parece formar uma ponte molecular entre o citoesqueleto muscular e a matriz extracelular, promovendo um comprometimento da geração do

mecanismo de estabilidade do músculo. Estudos sugerem que a distrofina estabiliza a membrana das miofibras durante a contração muscular, pois os músculos deficientes de distrofina têm maior disposição a injúrias de contração que a musculatura normal (CHILDERS et al, 2002).

A descoberta da distrofina permitiu o reconhecimento de outros animais com lesões em seus genes. Camundongos deficientes em distrofina, cães e gatos (que surgiu por mutação espontânea) inclusive, mais recentemente, nematóides desempenham vários papéis importantes na investigação sobre as funções da distrofina (BLAKE, 2002).

Segundo Valentine et al (1989), o músculo sem a proteína distrofina fica mais susceptível a lesões induzidas pelo exercício, fato evidenciado pelo rápido influxo de enzimas musculares. Considerando que esse complexo protéico está embebido no sarcolema e fornece a ligação entre o citoesqueleto interno da célula muscular e a matrix extracelular, a perda desta proteína destrói essa ligação e então gera a degeneração muscular (DAVIES, 1997).

Recentemente a expressão de distrofina também foi encontrada em células endoteliais de humanos e camundongos normais. Essa distrofina endotelial aparece para realizar funções críticas na regulação do fluxo sanguíneo, mediação da dilatação arteriolar, manutenção da expressão e sintaxe do óxido nítrico endotelial e adaptação da densidade vascular na musculatura esquelética (NGUYEN et al, 2002).

O uso do modelo GRMD apresenta algumas dificuldades como o alto custo e emotividade dos animais para com seus tratadores. Entretanto as semelhanças fisiológicas são notáveis. Entre elas estão a elevada atividade da creatina quinase no sangue e atrofia muscular generalizada. Os filhotes afetados são mais fracos, ganham menos peso e possuem maior dificuldade de sucção em relação aos filhotes normais. Geralmente vêm a óbito devido à degeneração dos músculos cardíacos (PERES, 2009).

4.5 TNF α

Embora as mutações na proteína distrofina representem a principal causa da DMD, são os processos secundários que envolvem inflamação persistente e regeneração comprometida que contribuem para a progressão exacerbada da doença (ABDEL-SALAM et al, 2009). O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória produzida primariamente por células do sistema imune, como neutrófilos, linfócitos e principalmente por macrófagos e monócitos que se acumulam rapidamente no local da lesão; seus níveis são elevados em muitas doenças patogênicas incluindo lesões cardiovasculares (ABDEL-SALAM et al, 2009; DHINGRA et al, 2009; CHIU et al, 2010; KOHARA et al, 2011).

Os mastócitos estão constitutivamente presentes em tecidos conjuntivos musculares, servem como fonte de citocinas para iniciar a inflamação, rapidamente se concentram na região injuriada mesmo após um leve dano e estão cronicamente presentes na DMD e transitoriamente em músculos *mdx*. Inclusive, os mastócitos também são capazes de armazenar TNF- α , e dessa forma contribuem para a liberação de citocinas em sítios de lesão. Dessa forma, a inflamação não depende de transcrição gênica elevada para ser exacerbada (PORTER et al, 2002).

Essa citocina necrótica é um indutor da inflamação, que é considerada precoce após lesão tecidual. A expressão de TNF- α em miofibras na DMD pode induzir a inflamação sem a necessidade de uma resposta primária em células mononucleares (PORTER et al, 2002).

Uma melhor compreensão do papel da inflamação no processo da doença pode ajudar na terapia da DMD de duas formas: facilitar diretamente as terapias a fim de atrasar/bloquear a doença ou indiretamente, através da melhoria das estratégias, contribuir para o sucesso do transplante de mioblastos capazes de expressar a distrofina (PORTER et al, 2002).

A reação inflamatória secundária pode contribuir fortemente para a progressão das distrofinopatias por meio de vias inflamatórias e citocinas que são superexpressadas no músculo de indivíduos distróficos. Entre as diversas citocinas

pró-inflamatórias um papel importante e primário pode ser atribuído ao TNF- α , envolvido em doenças como músculo-caquexia induzida. Foi relatado que a média dos valores de concentração de TNF- α em pacientes com distrofia muscular de Duchenne foi de aproximadamente 1.000 vezes maior do que em indivíduos saudáveis e que os níveis de TNF- α estão muito acima do normal nos músculos distróficos de modelos animais como em pacientes com DMD. Os níveis de TNF- α aumentam rapidamente em fibras musculares danificadas e o fator de necrose tumoral é expresso por mioblastos e miotubos. Algumas características como sua alta concentração em fibras musculares injuriadas e no músculo esquelético miopático além do fato de ser quimiotático para mioblastos *in vitro* e mitogênico para células-satélites *in vivo*; sugerem um papel direto do TNF- α na miogênese da regeneração muscular (ABDEL-SALAM et al, 2009).

Pacientes com DMD têm elevados níveis de TNF- α e fibras TNF- α positivas foram encontrados por *in situ* hibridização e imunohistoquímica nos músculos dos indivíduos com DMD (PIERNO et al, 2007). A longo prazo, a superexpressão do TnF- α provoca a indução de apoptose de cardiomiócitos, que contribui para a fisiopatologia de diversas doenças cardíacas (DHINGRA et al, 2009).

4.6 MIOSTATINA

Um componente da família TGF- β , miostatina, é um regulador negativo do crescimento do músculo esquelético. A redução ou total eliminação da miostatina pode ser um tratamento para doenças musculares degenerativas, como a distrofia muscular. Estudos *in vitro* mostraram que ela inibe a proliferação celular e síntese de proteínas em mioblastos. O uso de anticorpos para bloqueio da miostatina e a sua eliminação por *knout out*, aumentou relevantemente a degeneração do músculo (LI et al, 2005).

A miostatina é uma proteína produzida principalmente em células do músculo esquelético e que circula no sangue na forma de dímeros inativo. Durante a regeneração muscular, ela inibe a atividade das células satélites devido ao seu controle

no movimento dos macrófagos. Possui como antagonista de sua ação a follistatina que também inibe outros membros da família TGF- β (HIROKI et al, 2011).

Segundo McPherron e Lee (1997) muitos estudos apresentaram uma relação negativa entre a miostatina e a massa muscular. Bovinos com hipertrofia muscular possuem mutações no gene da miostatina, outro exemplo de estudo mostrando a associação da miostatina e sua ação sobre a musculatura foi observado na ausência desta proteína em ratos com aumento da massa muscular que resultou em hiperplasia e hipertrofia da fibra muscular. E também a expressão sistêmica aumentada da miostatina em ratos adultos levou a ter significativa perda de músculo e gordura.

Tratamento farmacológico com anticorpo para a miostatina mostrou aumento da massa e força do músculo esquelético em estudo de musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca (GUIZONI et al, 2009).

4.7 TGF β

A proteína TGF- β é um fator de crescimento que constitui uma superfamília com um papel importante na fibrogênese (ZHAO et al, 2010). Estudos de TGF- β em camundongos *mdx* mostram que em nível celular as quantidades de TGF- β são maiores no diafragma e no quadríceps por causa de algum fator externo, no caso ao fator da ausência de distrofina e supõem que a TGF- β tenha algum papel na deposição de fibrose nesses músculos (TANIGUTI et al, 2011). A TGF- β é uma proteína muscular que pode contribuir para o aparecimento da fibrose e agravar as doenças musculares. São necessários tratamentos que reduzam a ação da TGF- β para reduzir as fibroses das distrofias musculares. As fibroses resultam do excesso de deposição do tecido conjuntivo, fator de incapacitação das funções musculares (COHN et al, 2007). No músculo cardíaco o TGF- β pode induzir cardiomiócitos a hipertrofia enquanto fibroblastos cardíacos respondem com diferenciação em miofibroblastos e síntese de colágeno (BARENDRECHT et al, 2007). O TGF- β 1 e β 2 tem um papel importante na fibrogênese, enquanto o TGF- β 3 tem uma função de anti-fibrótico. São proteínas chave

para a regulação do processo entre a fibrose e a inflamação muscular, apresentando altos níveis em camundongos *mdx* e em pacientes afetados com Duchenne. Enquanto ainda não se sabe a fonte de TGF- β , fibroblastos e leucócitos são susceptíveis de serem importantes participantes (VETRONE et al, 2009).

4.8 NF-KAPPA β

O NF-KAPPA β , fator nuclear KAPPA β , é um fator de transição pleiotrópico ativado por baixos níveis de reativos intermediários do oxigênio e inibido por antioxidantes (HNIA et al, 2008). Em mamíferos, a família NF-kB de fatores de transcrição consiste em cinco subunidades ou seja, p65 ou RelA, RelB, c-Rel, p50 e p52, que se homo ou heterodimerizam uns com os outros (ACHARYYA et al, 2010). Esse fator regula a expressão de genes relacionados com a inflamação, imunidade e resposta a estresse agudo. Após a degradação proteossomal da proteína inibitória I-kB, o nF-kB se transloca para o núcleo e liga elementos de DNA ao promotor de genes de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular, imunoreceptores e enzimas inflamatórias, como óxido nítrico sintase (nNOS), metaloproteinases de matriz (MMP) e fosfolipase A2. Há estudos que apontem envolvimento da NF-k β no processo de desgaste muscular, foram observados aumento da reação imunológica do NF-K β no citoplasma em todas as fibras regeneradas e em de 20 a 40% das fibras necrosadas em pacientes DMD. Esse fator ainda é ativado em resposta a secreção severa de moléculas de inflamação como a interleucina e TNF- α , que já são encontradas em níveis elevados em pacientes deficientes de distrofina e em outros tipos de distrofias musculares (HNIA et al, 2008). A inibição do NF-K β nas vias de sinalização melhora a patogênese no músculo esquelético e proporciona ganho funcional em camundongos *mdx* (DOGRA et al, 2008). Ele representa uma via de sinalização que tem sido relacionada a resposta em lesões inflamatórias e a uma reparação atenuada. Quando estimulado com sinais clássicos, induz mediadores como TNF- α ou IL1B, um montante complexo I κ B quinase (IKK) é ativado, o que resulta na fosforilação e degradação das proteínas I κ B, liberando o dímero de NF-k β de translocar para o núcleo para ativar

transcrição. Dependendo das condições do estímulo e do tipo da célula o NF- κ B mantém uma via de sinalização de *feedback* negativo, ativando a transcrição de I κ Ba que re-sequestra o complexo NF- κ B no citoplasma ou *feedback* positivo, sintetizando o seu próprio indutor, TNF, que pode reativar o caminho. Principalmente implicados na resposta imunitária, NF- κ B regulam negativamente a diferenciação do músculo esquelético (ACHARYYA et al, 2010).

4.9 UTROFINA

A utrofina é uma proteína homóloga a distrofina e apresenta similaridades tanto em tamanho, quanto em estrutura, e embora seja principalmente localizada na junção neuromuscular no músculo adulto, pode funcionalmente tomar o lugar da distrofina em toda a membrana muscular, ajudando a reestabelecer o complexo de glicoproteína de distrofina, estabilizar o sarcolema, e aliviar a doença também funcionalmente. Esta proteína autossômica foi identificado em 1989 e nos humanos o gene está localizado no cromossoma 6q24.

Obviamente, a distrofina e a utrofina possuem localização subcelular distinta em músculos estriados adultos. No entanto, a expressão de utrofina ocorre antes que a distrofina no desenvolvimento e regeneração muscular, onde é detectada ao longo do sarcolema muscular. No momento do nascimento e / ou no músculo maduro, a utrofina é então substituída por distrofina ao longo do sarcolema, por esta razão, a utrofina tem sido considerada uma proteína fetal homóloga da distrofina no desenvolvimento de tecidos musculares, o que sugere que as duas proteínas podem compartilhar funções comuns na estrutura muscular e/ou fisiologia (SQUIRE et al, 2002; RAFAEL et al, 1998).

4.10 VEGF

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína dimérica produzida por células neoplásicas, macrófagos e, às vezes, também por linfócitos. Entre as múltiplas ações nas células endoteliais, o VEGF age como um mitógeno específico em veias, artérias e vasos linfáticos, além de se constituir em um fator inibidor de apoptose (por meio de estimulação da produção da proteína antiapoptótica Bcl-2, nestas células). Também pode afetar a permeabilidade do endotélio, porém para sua ação angiogênica atuar, não é necessário que ocorra a ação de aumento de permeabilidade endotelial (PLATE, 2001).

VEGF é um importante fator angiogênico, produzido por macrófagos, linfócitos T, células tumorais e pelo citotrofoblasto, e representa papel fundamental como regulador na proliferação celular endotelial e permeabilidade vascular; contribui para a manutenção funcional dos vasos e inibe a apoptose das células endoteliais (FERRARA; HENZEL, 1989). A inibição do VEGF desregula o balanço apoptose/proliferação, resultando em embriogênese defeituosa e danos graves nos tecidos maduros (KASAHARA et al, 2000). Possui um importante papel na manutenção da integridade da barreira de filtração glomerular e sua inibição poderia levar a proteinúria (BDOLAH et al, 2004).

Estudos relatam que pacientes recebendo antagonistas de VEGF para o tratamento de câncer podem desenvolver hipertensão, proteinúria e dano no endotélio 22 glomerular (KABBINAVAR et al, 2003; PATEL et al, 2008). A família VEGF de proteínas inclui VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, fator de crescimento placentário (PIGF), e seus receptores VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR e VEGFR-3/Flt-4. Eles compartilham características típicas estruturais, porém, apresentam atividades biológicas diferentes (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003).

O gene que codifica VEGF é altamente polimórfico, está localizado no cromossomo 6p21.3 e contém 14kb na região codificante com oito éxons e sete íntrons (VINCENTI et al, 1996). No mínimo, 30 polimorfismos foram descritos neste gene,

sendo que alguns estão associados com a produção da proteína VEGF (WATSON et al, 2000; BÁNYÁSZ et al, 2006).

5 Material e Método

5 MATERIAL E MÉTODO

O projeto proposto está sendo conduzido após avaliação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), protocolado sob nº 1979/2010, aprovado pela “Comissão de Ética no uso de animais”, desta mesma faculdade.

5.1 ANIMAIS

Para este trabalho foram selecionados 6 cães machos distróficos, oriundos de fêmeas selecionadas portadoras do gene da distrofia muscular progressiva, com o sêmen de cães afetados pela mesma doença (sêmen a fresco). Em cada ninhada, proveniente das inseminações, foram realizados exames como dosagem de CK (creatinina-quinase) e DNA para confirmar a ausência do gene da distrofina e assim, poder selecionar os cães afetados pela doença. Os seis cães machos afetados pela distrofia muscular (GRMD), foram estudados dos 80 dias aos 10 meses de idade, estes, pertencentes ao grupo de animais do canil GRMD Brasil localizado no Departamento de Anatomia e Cirurgia da FMVZ-USP. Os animais foram mantidos sob condições adequadas de cuidados médicos veterinários, alimentação, higiene, e recreação, mesmo após o tratamento experimental, estes animais não foram eutanasiados, podendo terem sido reutilizados para outros fins experimentais. Os diagnósticos de Distrofia Muscular e de estado normal de saúde necessários para a seleção dos animais foram realizados pela equipe do Canil GRMD Brasil do Departamento de Anatomia e Cirurgia da FMVZ - USP. Todos os animais foram microchipados com 60 dias de vida.

5.1 PCR para seleção dos animais experimentais

Extração do DNA genômico

Amostras de sangue de 7 animais foram utilizadas para a extração do DNA utilizando o KiT GFX (GE), utilizando-se 300 µL de acordo com instruções do fabricante. Todas as amostras de DNA foram armazenadas em TE buffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0) a 4°C.

Amplificação do DNA genômico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Para a amplificação do fragmento do gene da distrofina na região da mutação que causa a distrofia muscular foram utilizados dois primers localizados no exons 6 (GR 1) e no íntron 7 (GR 2), descritos a baixo, produzindo um produto de 310 pares de base (pb).

GR1 CTTAAGGAATGATGGGCATGGG exon 6 (Forward ou Iniciador)

GR2 ATGCATAGTTTCTCTATCATGC intron 7 (Reverse ou Inverso) (BARTLETT, 1996)

Genotipagem

Foi utilizada para detectar o alelo afetado via digestão enzimática, por meio da enzima de restrição *Sau* 96I. 10 µL do produto amplificado por PCR de 310 pb foi submetido a digestão com 2 U da enzima *Sau* 96I em volume final de 20 µL.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Uma vez que esses cães (GRMD) apresentam limitações clínicas, e são de difícil aquisição (pelo baixo número de exemplares que sobrevivem), utilizamos dois cães sem raça definida (SRD), para o teste dos medicamentos, e ajuste das doses, como piloto do projeto, durante 2 meses, seguindo o mesmo protocolo terapêutico que será utilizado nos cães GRMD experimentais.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, o grupo experimental contendo 4 cães machos GRMD e o grupo controle contendo 2 cães machos GRMD. A identificação dos mesmos segue de acordo com os últimos 4 números de seus microchips, como mostra o Quadro 2:

Quadro 2: Identificação dos animais experimentais e controles (São Paulo, 2012)

Identificação do microchip	Identificação do animal	Grupo
985154000172974	E1	Experimental
985154000171860	E2	Experimental
985154000172971	E3	Experimental
985154000171936	E4	Experimental
985154000172934	C1	Controle
985154000172997	C2	Controle

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Todos os animais receberam os cuidados médicos que se fizeram necessários em função da progressão da doença e possíveis efeitos colaterais do tratamento proposto.

5.3 MEDICAMENTOS

São dois grupos, o grupo de cães controle e o grupo de cães que são submetidos ao tratamento medicamentoso, recebem os seguintes medicamentos, concomitantemente: 1. Sildenafil; 2. Acido ursodesoxicólico; 3. Acetilcisteína; 4. Losartan; 5. Micofenolato mofetil; 6. Talidomida; 7. Diltiazem. Segue abaixo a dosagem, frequência e a referência utilizada para delinear o coquetel medicamentoso em cães (Quadro 3).

Quadro 3: Posologia utilizada para coquetel medicamentoso (São Paulo, 2012)

Medicamento	Dose	Frequência	Referência
Sildenafil	5 mg/kg	Uma vez ao dia	Lorenzetti (2007)
Acido ursodesoxicólico	10 mg/kg	Uma vez ao dia	Nicholson et al (1996)
Acetilcisteína	40 mg/dia	Uma vez ao dia	Webster & Cooper (2009)
Losartana Potássica	3,5 mg/kg	Uma vez ao dia	Silva (2009)
Micofenolato mofetil	10 mg/kg	Uma vez ao dia	Lee et al (2010)
Talidomida	13 mg/kg	Uma vez ao dia	Teo et al (2000)
Diltiazem	1,5 mg/kg	Uma vez ao dia	Ramirez et al (2003)

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

5.4 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

As amostras foram enviadas para o laboratório de análises laboratoriais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Para realização do hemograma, foi utilizado o EDTA como anticoagulante. O hemograma avaliou de maneira geral, a presença de anemia ou desidratação nos cães. O leucograma utilizamos para avaliar se houve presença de inflamação, infecção ou toxicidade medicamentosa, entre outras interpretações.

Para a realização da bioquímica sérica, foi utilizado tubo de coleta seco. A bioquímica sérica avaliou creatinina; uréia; proteína total; albumina; fosfatase alcalina; TGP e CK.

As avaliações foram realizadas a cada 4 meses, sendo uma coleta antes do tratamento, uma durante o tratamento e outra coleta após o término do tratamento.

5.5 BIÓPSIA MUSCULAR

A coleta dos fragmentos musculares foi realizada através da retirada do ventre do músculo bíceps femoral do membro pélvico, alternando o lado direito e esquerdo de cada um dos cães (experimental e controle).

Após a coleta do fragmento muscular, o mesmo foi seccionado em 2 partes, cada uma delas armazenada em freezer -80°C; e a outra em glutaraldeído 2,5%, com a finalidade de avaliar posteriormente as amostras para técnicas de PCR, histologia básica e imuno-histoquímica.

Essas avaliações foram feitas a cada 4 meses, sendo uma coleta antes do tratamento, uma durante o tratamento e outra coleta após o término do tratamento.

5.6 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

Os fragmentos musculares foram desidratados em séries crescentes de etanóis (70% a 100%) por uma hora cada. A etapa de diafanização foi feita com duas imersões em xilol por 1 hora cada um, para inclusão em parafina líquida a 60°C (Histosec - Merck Chemicals®, Darmstadt, Alemanha) por 12 horas, confeccionando-se blocos retangulares com base de 4x5 cm.

Após o a inclusão do material na parafina, os blocos contendo as amostras foram cortados em micrótomo automático Leica RM2165 (Leica, Wetzlar, Alemanha) produzindo cortes de aproximadamente 5 µm. Os cortes obtidos foram devidamente assentados em lâminas histológicas e deixados na estufa a 60°C durante 2 horas para melhor adesão à lâmina.

Essas avaliações foram feitas a cada 4 meses, sendo uma coleta antes do tratamento, uma durante o tratamento e outra coleta após o término do tratamento.

5.6.1 Hematoxilina-Eosina

Os cortes obtidos foram mergulhados no xilol I e II por 4 minutos em cada, em seguida, desidratados em séries decrescentes de alcoóis (100%, 90%, 80%, 70%), por 4 minutos cada passagem. Após lavagem em água corrente por 10 minutos os materiais foram corados com hematoxilina (Merck Chemicals®, Darmstadt, Alemanha) por 3 minutos e o material foi lavado em água corrente por 10 minutos para a retirada do excesso de hematoxilina. Logo em seguida, o material foi corado pela eosina (Merck Chemicals®, Darmstadt, Alemanha) por 1 minuto e lavado com água por 4 minutos. Para finalização, o material corado foi submetido a uma série de alcoóis de 95%, uma vez e duas vezes álcool 100%, por 4 minutos cada e em série de xilóis (I, II) por 4 minutos cada.

O material obtido foi montando em solução de Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) e analisado através de microscopia de luz no microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc.

5.6.2 Tricomo de Masson

Os cortes obtidos foram mergulhados no xilol I e II por 4 minutos em cada, em seguida, desidratados em séries decrescentes de alcoóis (100%, 90%, 80%, 70%), por 4 minutos cada passagem. Após lavagem em água destilada por 5 minutos os materiais foram corados com hematoxilina (Merck Chemicals®, Darmstadt, Alemanha) por 1 minuto e 30 segundos e o material foi lavado em água corrente por 2 minutos para a retirada do excesso de hematoxilina e então, 5 minutos na água destilada. Logo em seguida, o material foi corado pela Fucsina ácida por 5 minutos e lavado com água destilada por 5 minutos, corado com Ácido fosfotúngstico – ácido fosfomolibdico por 10 minutos, Azul de anilina por 10 minutos e então água destilada por 5 minutos. Os materiais foram mantidos em ácido acético 1% por 3 minutos e água destilada por 10 minutos. Para finalização, o material corado foi submetido a uma série de alcoóis de

70%, 90%, 100%, 100%, 100% apenas uma rápida passagem em cada álcool, e por 4 minutos em cada série de xilóis (I, II) por 5 minutos cada.

O material obtido foi montando em solução de Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) e analisado através de microscopia de luz no microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc.

5.7 MORFOMETRIA DAS CÉLULAS MUSCULARES

As lâminas previamente coradas com Hematoxilina-eosina, foram analisadas no microscópio Olympus BX 60, com o auxílio de uma grade de 60 µm de distância, na objetiva de 40x, as células musculares foram contadas com o auxílio de um contador de células manual. Foram contados 5 campos diferentes, e então, tirada uma média do número de células de cada animal afetado nos diferentes momentos de coleta (T0, Tt e Tf).

5.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos de 5µm de espessura, dispostos em lâminas silanizadas.

O protocolo foi realizado em 2 dias consecutivos:

No 1º dia realizada a desparafinização, com xilol I e II na estufa 60°C por 5 minutos cada, Álcool + Xilol na estufa 60° C durante 30 segundos, e então a temperatura ambiente Álcool 100%, 90%, 70% e água destilada por 30 segundos cada. Após o procedimento de desparafinização, seguido o protocolo com o Desmascaramento em tampão citrato 1x (pH 6,0) diluído em *PBS* no forno microondas, 3 vezes de 3 minutos, ou até ferver.

Os materiais foram mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos e então feito o bloqueio da peroxidase em solução de H₂O₂ 3%, diluído em metanol por 5 minutos. Os materiais foram lavados em *PBS* 1x com *Tween* 3 vezes durante 5 minutos cada lavagem. Bloqueio das reações inespecíficas com “*Protein Block*” por 30 minutos e novamente os materiais foram lavados em *PBS* 1x com *Tween* 3 vezes durante 5 minutos cada lavagem. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário diluído em *PBS* 1x, como mostra o Quadro 4. Finalizando o 1º dia, as lâminas ficam “*overnight*” a 4°C, em câmara úmida, o controle negativo não recebeu o anticorpo primário.

Quadro 4: Anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica (São Paulo, 2012)

Anticorpos	Marca	Diluição
Distrofina	Santa Cruz®	1:50
TGF-beta	Santa Cruz®	1:50
Nf-Kappa-Beta	Santa Cruz®	1:50

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

No 2º dia do protocolo, as lâminas foram lavadas 3 vezes com *PBS* 1x com *Tween*, por 5 minutos cada lavagem, e então incubado com o anticorpo secundário (biotinylated goat anti-rabbit, Jackson Immunoresearch) por 30 minutos, lavadas novamente 3 vezes com *PBS* 1x com *Tween*, por 5 minutos cada lavagem e em seguida incubadas com o complexo estreptavidina-peroxidase (Jackson Immunoresearch 10µg/mL), por 30 minutos. Novamente lavadas 3 vezes com *PBS* com *Tween* por 5 minutos em cada lavagem. Os cortes foram revelados com DAB (diaminobenzidina - Dako), lavadas 3 vezes com *PBS* com *Tween* por 5 minutos em cada lavagem, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 5 segundos, água destilada por 5 minutos e água amoniacal por 3 segundos e novamente água destilada por 5 segundos. Seguido então a diafanização, com série crescente de alcoóis 70%, 90%, 100%, álcool + Xilol, por 30 segundos em cada passagem, Xilol I e II por 5 minutos em cada.

O material obtido foi montado em solução de Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) e analisado através de microscopia de luz no microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc.

Para a quantificação da imunomarcação, foram feitas 5 lâminas de cada tecido em cortes não sequenciais, previamente processada com o protocolo de imunohistoquímica. Destacando cada marcador, 5 fotos por lâmina foram quantificadas em área da foto X porcentagem marcação, feito no programa AxioVision 4.8, câmera AxioCam HRc e microscópio Olympus BX60 em objetiva de 40X. Para cada amostra, foi tirada uma média.

Essas avaliações foram feitas a cada 4 meses, sendo uma coleta antes do tratamento, uma durante o tratamento e outra coleta após o término do tratamento.

5.9 PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PARA OS GENES MIOSTATINA, UTROFINA, TGF- β , TNF- α , DISTROFINA E VEGF.

Fragmentos do músculo bíceps femoral dos cães afetados, grupo controle e experimental, e um fragmento de dois cães normais (Quadro 5) foram coletados e congelados para extração de RNA.

Quadro 5: Animais e momentos de coleta. (São Paulo, 2012)

Grupo controle		Grupo experimental		Grupo normal	
C1	Tt	E1	T0	Normal	T0
C1	Tf	E1	Tf	Normal	T0
C2	T0	E2	T0		
C2	Tt	E2	Tt		
		E3	T0		
		E4	T0		
		E4	Tt		
		E4	Tf		

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

5.9.1 Extração de RNA total

As amostras foram retiradas do nitrogênio, ainda dentro de seus respectivos tubos *eppendorf* e colocadas no gelo seco por 10 minutos, após os tubos com as amostras foram colocadas em gelo para descongelar e então, as amostras foram pesadas.

Para a extração de RNA total, seguimos recomendações do protocolo de Trizol (Quiagen®). Adicionamos 1 ml de trizol para cada 20mg de material, aproximadamente; adicionamos 200µl de clorofórmio por ml de Trizol nos tubos seguido por centrifugação 12000rcf para a separação em duas partes da mistura. Em seguida, a parte superior (incolor) da amostra foi transferida para um novo tubo e adicionado 500µl de isopropil por ml de Trizol inicial. O material foi deixado a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente centrifugado 12000 rcf por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet resultante lavado com etanol 75% centrifugando a amostra a 7500rcf por 5 minutos. Adicionou-se 100µl de água DEPC no tubo e este deixado em banho seco a 55°C por 10 minutos. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria (ND-2000, Nanodrop®). Medida a absorbância, o material foi estocado em freezer -80°C para posterior uso. A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interfira nos resultados, todas as amostras de RNA total serão tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR.

5.9.2 Síntese de cDNA fita dupla

Transcrição Reversa

Para a reação de transcrição reversa foi utilizado 1 µg de RNA tratado com 2U DNase I (RNase free, Fermentas), 20U RNaseOUT (Invitrogen) e 1X SuperScript III Buffer (Invitrogen) e água deionizada (Milli-Q®) em um volume total de 10 µL de reação. Esta mistura foi incubada inicialmente a 37 °C por 10 min e depois a 75 °C por 5 min.

Adicionou-se, posteriormente, para cada reação 0,77 mM dNTP (Fermentas, Thermo-Scientific), 500 µg Oligo(dT)18 primer (Fermentas, Thermo-Scientific) e 1 µL água deionizada e incubou-se por 10 min a 65 °C. A seguir acrescentou-se à reação: 1X SuperScript III Buffer (Invitrogen), 5 mM DTT (Invitrogen), 20U RNaseOUT (Invitrogen), 1 µL enzima SuperScript III Buffer (Invitrogen) e 0,5 µL água deionizada e incubou-se a 25 °C por 10 minutos, a 55 °C por 2 horas e a 75 °C por 15 min.

Por fim, foi adicionado a cada reação 1 µL RNaseH (Fermentas) e incubou-se por 30 minutos a 37 °C e por 10 minutos a 72 °C. Cada amostra (20 µL) foi diluída adicionando-se 40 µL de água deionizada e essas soluções foram armazenadas em alíquotas a -20°C.

qRT-PCR

Primeiramente, os tecidos tiveram o seu RNA extraído utilizando Trizol, conforme recomendado pelo fabricante.

Esses RNAs foram utilizados como molde na reação de transcrição reversa, para a síntese de cDNA fita dupla, conforme descrito acima.

Para normalização dos dados foi utilizado o gene endógeno GAPDH de *Canis familiaris*. Para análise da expressão foram utilizados os genes Distrofina, Miostatina, Utrofina, TNF-alfa, TGF-beta, VEGF (Quadro 6).

Quadro 6: Sequências dos oligonucleotídeos de cão utilizados para a quantificação da expressão gênica em tecidos musculares (São Paulo, 2012)

<i>Primer</i>	Sequência
Distrofina F	TGAACGAGCCCCTTCCTTTC
Distrofina R	ACCGGCCAAATGACTTGTCT
Miostatina F	CTGAGACCCGTCAAGACTCC
Miostatina R	AGGGATTGAGCCCATCTTCT
Utrofina F	TTTTGATGAATGCTCGTGGA
Utrofina R	CAATTTGGGCTCTCTCCTCA
TGF-beta F	AGTTAAAAGCGGAGCAGCATGTGG
TGF-beta R	GATCCTTGCGGAAGTCAATGTAGAGC
TNF-alfa F	CTTCTCGAACCCCAAGTGACAAG
TNF-alfa R	ATCAGCTGGTTGTCTGTCA
VEGF-A F	TTGCTGCTCTACCTCCACCAT
VEGF-A R	TGTGCTCTCCTCCTGCCATAG
GAPDH F	AGTATGATTCTACCCACGGCAAA
GAPDH R	CACAACATACTCAGCACCAGCAT

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

Padronização dos primers e da concentração de cDNA para qRT-PCR

A padronização dos primers por PCR em tempo real mostrou que as sequências de oligonucleotídeos escolhidas eram eficientes para a amplificação.

Os cDNAs produzidos foram então utilizados em reações de PCR em tempo real. Os primers usados na amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados com

o auxílio do programa computacional Primer Express versão 2.0 (Applied Biosystems), respeitando as seguintes especificações: amplificar fragmentos cujo tamanho varie entre 50-150bp, apresentar quantidade de CG entre 30 e 80%, não apresentar a capacidade de formar dímero ou de estrutura secundária, apresentar temperatura de anelamento entre 58 °C e 60 °C de acordo com o algoritmo nearest neighbor. Além disso, a fim de evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico contaminante, os pares de primers foram desenhados em exons diferentes do gene. Para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR em tempo real foi utilizado o reagente SYBR[®] Green Dye (Applied Biosystems). Para a normalização dos dados, foi utilizado o primer para o gene de expressão constitutiva, GAPDH, como controle interno da reação.

Para tanto, diferentes concentrações de primers foram testadas: 100, 200, 400 e 600 nM com misturas de cDNAs diluídas em séries. Com este ensaio, pode-se determinar a concentração ótima de primers que é caracterizada como, a menor concentração onde o Ct e o perfil da curva de amplificação não apresentassem grandes variações em relação às maiores concentrações com uma menor formação de dímeros de primers (quando estes estão presentes). Após escolhidas as melhores concentrações dos primers (Quadro 7), tanto do endógeno quanto dos primers, a melhor concentração de cada primer foi testada com diferentes concentrações de cDNA: 1:10, 1:30, 1:60, 1:120, 1:240 e 1:480.

Quadro 7: Concentrações de primers selecionadas para utilização nas reações de qRT-PCR. São Paulo, 2012.

Primer	Concentração (nM)
Distrofina	600
Miostatina	400
Utrofina	600
TGF-beta	400
TNF-alfa	400
VEGF-A	200
GAPDH	200

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

A análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição fornece o coeficiente angular da reta (a, em $y=ax+b$) que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos primers, na seguinte fórmula:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

Em seguida foram realizados os testes de nível de expressão gênica dos genes de interesse em cada amostra por PCR em tempo real, utilizando as concentrações de primer e de cDNA escolhidas na padronização. Assim, a expressão do gene alvo foi determinada em relação à expressão do gene controle. Após a obtenção dos Cts de cada amostra, inicialmente, foi calculada a média dos Cts das réplicas (N=3). Dado que a expressão do gene é analisada em relação a uma amostra que é tomada como referência, calcula-se então a diferença entre a média dos Cts da amostra referência e a média dos Cts da amostra estudada. Essa diferença é definida como ΔC_p . O cálculo

do ΔC_p é realizado para os dados do gene alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos primers utilizados não é de 100%, é dada por:

$$ratio = \frac{Ef_{gene\text{alvo}}^{\Delta CP_{gene\text{alvo}}}}{Ef_{controle\text{endógeno}}^{\Delta CP_{controle\text{endógeno}}}}$$

6 Resultados

6 RESULTADOS

Os resultados estão separados em tópicos para facilitar a compreensão dos eventos.

6.1 ANIMAIS “PILOTO”

Utilizamos dois animais sem raça definida, irmãos de ninhada, um macho (1M) e uma fêmea (2F), a data aproximada de nascimento foi em março de 2010. Iniciamos o tratamento em julho de 2010, com as seguintes doses, dos seguintes medicamentos:

Dia 0 a dia 03: Acetilcisteína (40mg/kg) + Losartana (3,5mg/kg) + Mofetila (5mg/kg)

Dia 03 a dia 06: Acetilcisteína (40mg/kg) + Losartana (3,5mg/kg) + Mofetila (5mg/kg) + Sildenafil (5mg/kg) + Diltiazem (1,5mg/kg)

Dia 06 ao fim do tratamento: Acetilcisteína (40mg/kg) + Losartana (3,5mg/kg) + Mofetila (10mg/kg) + Sildenafil (5mg/kg) + Diltiazem (1,5mg/kg) + Talidomida (13mg/kg) + Ursacol (10mg/kg)

O fim do tratamento foi em outubro de 2010. Até o final do tratamento, os animais se apresentaram bem clinicamente. Os parâmetros clínicos foram avaliados diariamente até o dia 15 do tratamento, e após, eram avaliados quinzenalmente, os parâmetros eram frequência cardíaca e respiratória; pulso; TPC; linfonodos; mucosas; temperatura e estado geral do animal, além das observações vistas durante o exame físico.

Em nenhum dos dias da avaliação houve alteração dos parâmetros.

Após 4 meses do tratamento, os animais foram doados, e até o momento, não há nenhum relato de anormalidade clínica, física ou comportamental desses animais.

O próximo passo foi a administração desse coquetel aos animais afetados pela distrofia muscular da colônia GRMD-Brasil.

6.2 PCR PARA A SELEÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O teste foi validado utilizando-se amostras de DNA de cães normais, previamente diagnosticados como afetados e portadores da Distrofia Muscular de Duchenne. O diagnóstico foi baseado na mutação pontual herdada em cães distróficos que dá origem a um novo sítio da enzima de restrição *Sau 96I*. Foram utilizadas 25 amostras de sangue para extração de DNA para a otimização do teste, sendo caracterizadas como 8 normais, 7 portadores e 9 afetados, sendo 6 machos e 3 fêmeas. Utilizamos os machos afetados para nosso estudo (Figura 5). E então, foram sorteados os animais pertencentes a cada grupo, experimental e controle, anteriormente descritos no quadro 2.

Figura 5: Análise de PCR para o gene Xp21

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Legenda: As amostras são provenientes das ninhadas obtidas para o estudo, marcados com * são os animais selecionados (afetados pela distrofia).

6.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O tratamento experimental iniciou em março de 2011, da seguinte forma:

Dia 0 a dia 03: Acetilcisteína (40mg/kg) + Losartana (3,5mg/kg) + Mofetila (5mg/kg).

Dia 03 a dia 06: Acetilcisteína (40mg/kg) + Losartana (3,5mg/kg) + Mofetila (5mg/kg) + Sildenafil (5mg/kg) + Diltiazem (1,5mg/kg).

Dia 06 ao fim do tratamento: Acetilcisteína (40mg/kg) + Losartana (3,5mg/kg) + Mofetila (10mg/kg) + Sildenafil (5mg/kg) + Diltiazem (1,5mg/kg) + Talidomida (13mg/kg) + Ursacol (10mg/kg).

Durante o tratamento, um cão experimental veio a óbito, como descrito a seguir. E por esse motivo, não está descrito em nossos resultados.

Animal E3

Dia 01 de junho de 2011, o animal experimental E3 veio a óbito. A história pregressa da moléstia está descrita a seguir.

O animal apresentava disfagia e sialorréia desde antes do início do tratamento, em fevereiro de 2011. Mesmo quando tomava o medicamento, apresentava dificuldade na deglutição do mesmo, desta forma, nunca foi possível que ele ingerisse a quantidade certa e precisa do medicamento oferecido.

Em 18 de maio de 2011, o animal apresentou quadro de êmese, hiporexia e prostração acentuada. Foi coletado exame de sangue apresentando um discreto aumento na função renal (uréia e creatinina), o animal recebeu tratamento suporte e após 2 dias, foi coletado novamente exame de sangue, onde o quadro renal, regrediu, nos levando a acreditar que o quadro apresentado foi devida a desidratação.

O animal mesmo com seus parâmetros laboratoriais estáveis, iniciou quadro de anorexia e mantinha-se prostrado, mesmo com tratamento suporte.

Em 25 de maio de 2011, apresentou sinais de melhoras clínicas, pois levantou e foi interagir com os outros animais.

Em 27 de maio de 2011 o animal voltou ao seu quadro anterior, de intensa prostração e anorexia.

Em 01 de junho de 2011 coletado exame novamente, onde não foram observadas alterações significativas em função renal, hepática, nem em hemograma e leucograma. Durante a noite, o animal veio a óbito. Animal levado a necropsia, dia 02.06.2011, no Departamento de Patologia, realizada pelos veterinários residentes.

6.4 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

Os achados de hemograma, leucograma e bioquímica sérica, estão demonstrados em forma de gráficos, separados em: hematócrito, leucócitos, creatinina, uréia, TGP, albumina, proteína total, fosfatase alcalina e CK.

Os parâmetros de hemograma e leucograma que não estão demonstrados nos gráficos, não apresentaram nenhuma alteração. O animal E3, não está incluso nos gráficos, pois veio a óbito no início do tratamento.

Os animais controle, C1 E C2 apresentaram em todos os momentos, T0, Tt e Tf, significativa leucocitose. Os animais experimentais apresentaram maior variância entre os valores de leucócitos, o animal E2 apresentou leucocitose nos tempos T0 e Tf, no tempo Tt valores dentro dos padrões de normalidade. O animal E4 apresentou valores dentro dos padrões de normalidade em T0 e Tt e leucocitose em Tf. O animal E1 apresentou valores dentro dos padrões de normalidade em T0 e Tf, e leucocitose em Tt (Figura 6). Podemos observar na Tabela 1, a média dos animais do grupo controle e experimental, sendo a média do grupo controle maior quando comparada ao grupo experimental em todos os momentos (T0, Tt e Tf).

Figura 6: Representação gráfica das concentrações séricas (mm^3) de leucócitos em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 1 – Valores de leucócitos (mm^3) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	19400	17800	19000	18733
C2	16300	17800	20100	18066
E1	9100	16800	12000	11866
E2	6800	8900	21500	12400
E4	15900	14700	16900	15833
Média controles	17850	17800	19550	18400
Média experimentais	10600	13467	16800	13622

Valor de referência: 6000 – 15000/ mm^3

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Quando avaliado os valores de leucócitos observou-se que o grupo controle não apresentou uma variação na taxa de leucócitos no decorrer do experimento, apresentando um aumento não significativo, enquanto que o grupo tratado apresentou um aumento gradual da taxa de leucócitos mas considerado não significativo ($p > 0,05$) (Figura 7).

Figura 7: Dados estatísticos dos valores de leucócitos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

A porcentagem de hematócrito mostrou-se baixa nos dois grupos, experimental e controle, no momento T0. No momento Tt, os animais mantiveram-se dentro dos valores de normalidade, exceto os C2 e E4, controle e experimental, respectivamente. No Tf os animais controle mantiveram valores dentro dos padrões de normalidade, enquanto os animais experimentais, valores abaixo dos padrões de normalidade (Figura 8). A Tabela 2 demonstra a média dos dois grupos, controle e experimental, as duas médias dos grupos apresentam menor porcentagem em relação aos valores de normalidade, porém, o grupo experimental apresenta-se com valores ainda mais baixos.

Figura 8: Representação gráfica das concentrações séricas (%) de hematócrito em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 2 – Valores de hematócrito (%) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	36	40	40	38,5
C2	32	36	37	35
E1	18	37	28	27,5
E2	15	33	35	27,5
E4	32	37	35	34,5
Média controles	34	38	38,5	36,7
Média experimentais	21,7	35,7	32,7	29,8

Valor de referência: 37-54%

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

A dosagem das plaquetas se manteve inconstante nos dois grupos estudados. Nos animais controle, trombocitose em T0 e Tt, e permaneceu com trombocitose o

animal controle C2 no Tf, porém, no animal controle C1, apresentou dosagem dentro dos padrões de normalidade em Tf. No grupo experimental, o animal E2 apresentou trombocitose em T0 e Tt e valores dentro dos padrões de normalidade em Tf. O animal E4 apresentou valores dentro dos padrões de normalidade em T0 e Tf, e trombocitopenia, em Tt. O animal E1 apresentou valores dentro dos padrões de normalidade em T0 e Tf e trombocitose em Tt (Figura 9). Nota-se trombocitose na média dos animais pertencentes ao grupo controle, enquanto no grupo experimental, a média manteve-se dentro dos valores de normalidade (Tabela 3).

Figura 9: Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) de plaquetas em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 3 – Valores de plaquetas (mil) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	684000	613000	375000	557333
C2	915000	639000	616000	723333
E1	436000	620000	416000	490667
E2	330000	65000	388000	261000
E4	672000	581000	504000	585667
Média controles	799500	626000	495500	640333
Média experimentais	479333	422000	436000	445778

Valor de referência: 200000-500000

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

A concentração de uréia se manteve dentro dos padrões de normalidade em ambos os grupos, no T0. Aumento da concentração de uréia nos dois grupos no Tt. No Tf, os dois grupos mantiveram dentro dos padrões de normalidade, exceto o animal experimental E4 que apresentou um aumento de concentração (Figura 10), de acordo com esses resultados, não foi possível associar as alterações de uréia com o uso do coquetel medicamentoso. Quando feita a média da dosagem de uréia nos dois grupos estudados, ambos os grupos, controle e experimental tiveram a média acima de 40,0 mg/dL no Tt, porém, na média final dos grupos, não observamos significativa diferença (Tabela 4).

Figura 10: Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) da uréia em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 4 – Valores de uréia (mg/dL) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	19,1	48,5	28,4	32
C2	28,1	49,6	33,0	37,2
E1	45,6	60,1	24,3	43,3
E2	24,5	71,4	44,3	46,7
E4	31,1	49,6	25,5	35,4
Média controles	23,6	49	30,7	34,6
Média experimentais	33,7	60,3	31,4	41,8

Valor de referência: até 40 mg/dL

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

A concentração de creatinina foi dosada nos dois grupos, controle e experimental, e os valores mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade, como

mostra a Figura 11. Após a média dos grupos estudados (Tabela 5), podemos inferir que as alterações em uréia, provavelmente são em decorrência do metabolismo proteico, e não por uma disfunção renal.

Figura 11: Representação gráfica das concentrações séricas (mg/dL) da creatinina em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 5 – Valores de creatinina (mg/dL) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	0,55	0,5	0,66	0,57
C2	0,7	0,62	0,49	0,60
E1	0,77	0,38	0,41	0,52
E2	0,62	0,97	0,85	0,81
E4	0,65	0,81	0,55	0,67
Média controles	0,62	0,56	0,57	0,58
Média experimentais	0,68	0,72	0,60	0,67

Valor de referência: até 1,3 mg/dL

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

A dosagem de TGP se manteve aumentada nos dois grupos, controle e experimental, e em todos os momentos de avaliação, porém, mostrou um aumento mais significativo no grupo controle, nos momentos Tt e Tf, quando comparado com o grupo experimental (Figura 12). Na média dos grupos experimental e controle, a diferença permaneceu significativa, sendo maior no grupo controle comparado ao grupo experimental (Tabela 6). Isso nos evidencia uma maior degeneração muscular no grupo controle quando comparado com o grupo experimental.

Figura 12: Representação gráfica das concentrações séricas (U/L) do TGP em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 6 – Valores de TGP (U/L) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	320,4	301,6	412,8	344,9
C2	224,8	302,7	393,2	306,9
E1	222,9	214,2	64,7	167,3
E2	306,6	290,1	316,5	304,4
E4	216,1	210,1	318,6	248,2
Média controles	272,6	302,1	403	325,9
Média experimentais	248,5	238,1	233,7	239,9

Valor de referência: até 50 U/L

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Quando analisados animais no momento Tt, observou-se que os resultados entre os grupos controle e experimental diferem significativamente. O grupo experimental

apresentou diminuição significativa do TGP quando comparado com o grupo controle $p < 0,05$.

Quando analisados animais no momento Tf observou-se que os resultados entre os grupos controle e experimental diferem significativamente. O grupo experimental apresentou uma diminuição significativa do TGP quando comparado com o grupo controle $p < 0,05$.

O grupo controle no decorrer do tratamento apresentou um aumento extremamente significativo de TGP $p < 0,0001$. Enquanto o grupo experimental apresentou uma diminuição de TGP, mas não foi significativa entre os animais experimentais (Figura 13)

Figura 13: Estatística do grupo controle e experimental dos valores de TGP

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

Na dosagem da fosfatase alcalina, não houve alteração nos padrões de normalidade em nenhum dos dois grupos, controle e experimental (Figura 14), na Tabela 7 podemos visualizar a média dos animais dos dois grupos estudados. Isso demonstra que não houve distúrbio de colestase hepática nem toxicidade medicamentosa.

Figura 14: Representação gráfica das concentrações séricas (U/L) da fosfatase alcalina em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 7 – Valores de fosfatase alcalina (U/L) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	35,1	26,7	21,1	27,6
C2	30,1	23,2	52,2	35,1
E1	33,6	14,7	29,9	26,1
E2	39,2	29,6	31,3	33,4
E4	40,5	32,1	28,6	33,7
Média controles	32,6	24,9	36,6	31,3
Média experimentais	37,8	25,5	29,9	31,1

Valor de referência: até 130 U/L

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

A dosagem da proteína creatinina quinase, se mostrou aumentada em todos os momentos de avaliação, o que é esperado em animais com distrofia muscular. Nos animais do grupo controle houve um aumento mais significativo quando comparado

com os animais do grupo experimental (Figura 15). Nas médias dos grupos, controle e experimental, é evidente a diferença entre os grupos, mesmo ambos apresentando altos valores de creatinina quinase, a média do grupo controle manteve-se mais elevada do que o grupo experimental (Tabela 8). A CK está intimamente ligada com a degeneração e necrose da célula muscular, portanto uma redução nos valores de CK pode indicar diminuição de degeneração muscular .

Figura 15: Representação gráfica das concentrações séricas (U/L) de creatinina quinase em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 8 – Valores de creatinina quinase (U/L) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	11606	32962	27020	23863
C2	13378	18440	24650	18823
E1	7680	16508	3078	9089
E2	9789	15490	12176	12486
E4	8536	14074	18130	13580
Média controles	12492	25701	25835	21343
Média experimentais	8668	15357	11128	11718

Valor de referência: 20-220 U/L

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Quando avaliado o valor de creatina quinase o grupo controle apresentou um aumento extremamente significativo ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo experimental.

Quando avaliado o valor de creatina quinase o grupo experimental no momento Tt apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$), quando comparado ao momento T0, mas o grupo experimental no período Tf apresentou um aumento de creatina quinase não significativo quando comparado ao momento T0, e apresentou uma diminuição não significativa quando comparada ao momento Tt ($P > 0,05$) (Figura 16).

Figura 16: Médias estatísticas de creatina quinase, nos grupos controle e experimental

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

A albumina se manteve dentro dos padrões de normalidade, nos dois grupos, controle e experimental (Figura 17), também demonstrada as médias entre os grupos na Tabela 9, sem nenhuma alteração nos valores de normalidade. Isso nos confirma que a alteração em TGP foi decorrente de lesão muscular e não hepática.

Figura 17: Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) de albumina em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 9 – Valores de albumina (g/dL) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	3,1	3,1	3,2	3,1
C2	2,9	3,0	2,9	2,9
E1	3,0	3,1	2,9	3,0
E2	2,8	3,0	3,0	2,9
E4	2,8	2,7	2,8	2,8
Média controles	3,0	3,0	3,0	3,0
Média experimentais	2,9	2,9	2,9	2,9

Valor de referência: 2,5 – 4,5 g/dL

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

A proteína total se manteve dentro dos padrões de normalidade, nos dois grupos, controle e experimental (Figura 18), também demonstrado na Tabela 10, com a média entre os dois grupos estudados.

Figura 18: Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) de proteína total em diferentes momentos

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Tabela 10 – Valores de proteína total (g/dL) dos animais controles e experimentais, nos diferentes momentos T0, Tt e Tf. São Paulo, 2012

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
C1	6,1	6,3	6,7	6,4
C2	5,9	6,0	5,9	5,9
E1	6,1	7,4	5,6	6,4
E2	5,9	6,0	6,0	6,0
E4	6,0	5,9	5,8	5,9
Média controles	6,0	6,1	6,3	6,1
Média experimentais	6,0	6,4	5,8	6,1

Valor de referência: 5,5 – 8,0 g/dL

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Na Tabela 11 comparamos as médias dos valores encontrados nos exames acima citados, dos dois grupos estudados, grupo controle e grupo experimental, com os respectivos valores de referência. É possível observar que as alterações são mais evidentes no grupo controle, quando comparado com o grupo experimental. As diferenças mais significativas foram encontradas nas médias dos parâmetros de leucócitos, TGP e creatinina quinase.

Tabela 11 – Valores hematológicos e bioquímicos da média encontrada nos grupos controle e experimental (São Paulo, 2012)

	Média grupo controle	Média grupo experimental
Leucócitos (6 – 15 mil/mm³)	18400	13622
Hematócrito (37-54%)	36,7	29,8
Plaquetas (200 – 500 mil)	640333	445778
Uréia (até 40 mg/dL)	34,6	41,8
Creatinina (até 1,3 mg/dL)	0,58	0,67
TGP (até 50U/L)	325,9	239,9
Fosfatase Alcalina (até 130U/L)	31,3	31,1
CK (20-200 U/L)	21343	11718
Albumina (2,5 – 4,5 g/dL)	3,0	2,9
ProteínaTotal (5,5 – 8,0 g/dL)	6,1	6,1

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

6.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

O músculo de todos os animais dos dois grupos, controle e experimental foram coletados, emblocados e cortados no micrótomo. Utilizou-se as colorações H.E e Tricomo de Masson para avaliar a arquitetura tecidual. Não foram constadas alterações histopatológicas significantes entre os dois grupos estudados, como mostrado nos itens 6.5.1 Hematoxilina Eosina e 6.5.2 Tricomo de Masson.

6.5.1 Coloração Hematoxilina Eosina

Com a técnica de coloração Hematoxilina Eosina, podemos evidenciar o citoplasma das células, marcado pela eosina, de coloração mais rósea, enquanto os núcleos celulares, marcados pela hematoxilina, de coloração mais roxa. Nos cortes histológicos de músculo distrófico dos animais experimentais e controles, observamos fibras musculares de formas e tamanhos diferentes. Observamos também fibras heterogêneas no tamanho. Possível observar, nos cortes do momento Tt e Tf, presença de infiltrados inflamatórios e aumento gradativo de tecido conjuntivo.

O cão C1 apresentou no momento Tt a presença quantidade significativa de tecido conjuntivo na região de endomísio e mais abundante na região de perimísio, com células musculares hipertrofiadas e presença de infiltrado inflamatório na região de endomísio (Figura 19A). No momento Tf, observamos uma discreta diminuição de tecido conjuntivo quando comparado com o momento Tt, porém, as células musculares apresentam-se de forma mais desorganizadas, com diminuição das fibras musculares (Figura 19B).

O cão C2 no momento T0 apresentou uma arquitetura muscular definida, porém um aumento de deposição de tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório em região de perimísio, observamos também, células musculares hipertrofiadas e atrofiadas, indicando processos degenerativos (Figura 19C). No momento Tt há

um aumento da deposição de tecido conjuntivo na região de perímísio e também na região de endomísio, o que demonstra uma evolução na degeneração das fibras musculares quando comparadas com o momento T0. As células musculares se apresentam de forma mais heterogênea, com hipertrofia e atrofia das mesmas (Figura 19D).

Figura 19: Coloração Hematoxilina-eosina em corte de bíceps femoral do grupo controle

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Legenda: **A:** cão C1 momento Tt nota-se presença de infiltrado inflamatório (+), indicando áreas de degeneração e necrose de fibras musculares; abundante tecido conjuntivo (→), e células hipertrofiadas (*). **B:** cão C1 momento Tf nota-se abundante tecido conjuntivo (→) e áreas já com ausência de tecido muscular. **C:** Cão C2 Momento T0 nota-se presença de infiltrado inflamatório (+), indicando áreas de degeneração e necrose de fibras musculares; tecido conjuntivo (→), células hipertrofiadas (*). **D:** Cão C2 nota-se abundante tecido conjuntivo (→), presença de infiltrado inflamatório (+), indicando áreas de degeneração e necrose de fibras musculares; células hipertrofiadas (*). Coloração HE, aumento: 20x.

O cão E1 no momento T0 apresentou arquitetura tecidual preservada, com deposição exarcebado de tecido conjuntivo na região de perímísio e discreto

deposição em região de endomísio, infiltrado inflamatório e algumas células musculares hipertrofiadas (Figura 20A). No momento Tf podemos observar uma diminuição das fibras musculares, com uma aumento do espaço de endomísio e perimísio, porém não houve um aumento significativo de tecido conjuntivo, que podemos inferir ser devido ao tratamento com os medicamentos anti-inflamatórios (Figura 20B). Apesar de haver uma diminuição tecidual, pode ter ocorrido uma ação benéfica quando ao poder anti-inflamatório do coquetel medicamentoso.

O cão E2 no momento T0 apresentou perda de arquitetura muscular e abundando deposição de tecido conjuntivo na região de endomísio, presença de infiltrado inflamatório e células musculares com heterogenia (Figura 20C). No momento Tt houve um aumento da deposição de tecido colágeno, continuidade no processo inflamatório, pela presença de infiltrados inflamatório, e células musculares heterogenias, atróficas e hipertróficas (Figura 20D). No momento Tf há presença de abundante tecido conjuntivo na região de epimísio e células de tamanho heterogêneo (Figura 20E).

O cão E4 no momento T0 apresentou tecido conjuntivo na região de perimísio e abundante tecido conjuntivo na região de epimísio, observamos também, células musculares de tamanho heterogêneo e infiltrado inflamatório na região de perimísio (Figura 20F). No momento Tt observamos aumento do tecido conjuntivo na região de perimísio e endomísio, células musculares heterogêneas, porém, o tecido apresentando um na arquitetura tecidual ligeiramente definida quando comparado com o momento T0 (Figura 20G).

Figura 20: Coloração de Hematoxilina-eosina em corte de bíceps femoral do grupo experimental

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Legenda: **A:** Cão E1, momento T0 nota-se presença de infiltrado inflamatório (+), tecido conjuntivo (→), células hipertrofiadas (*). **B:** Cão E1, momento Tf nota-se tecido conjuntivo (→), e áreas com perda de tecido muscular. **C:** cão E2, momento T0 nota-se presença de infiltrado inflamatório (+). Em **D:** cão E2, momento Tt nota-se abundante tecido conjuntivo (→), infiltrado inflamatório (+), células hipertrofiadas (*). Em **E:** Momento Tf nota-se abundante tecido conjuntivo (→), células hipertrofiadas (*). **F:** cão E4, momento T0 nota-se a presença do epimísio (e), infiltrado inflamatório (+), células hipertrofiadas (*), tecido conjuntivo (→). Em **G:** cão E4, momento Tt nota-se abundante tecido conjuntivo (→), infiltrado inflamatório (+), células hipertrofiadas (*). Coloração HE, aumento: 20x.

6.5.2 Coloração de Tricomo de Masson

Através da técnica de Tricomo de Masson, podemos evidenciar na cor azul, colágeno e na cor vermelha, músculo. Os cortes histológicos de músculo distrófico, dos grupos, controle e experimental, evidenciaram a presença de colágeno no endomísio, perimísio e epimísio, como mostram as figuras a seguir.

O cão C1 no momento Tt apresentou tecido colágeno nas regiões de endomísio e perimísio, além de algumas células musculares hipertrofiadas (Figura 21A). No momento Tf observamos a presença do tecido colágeno, células de tamanho heterogêneo e uma aparente diminuição da deposição de colágeno na região de endomísio (Figura 21B).

O cão C2 no momento T0 apresentou uma estrutura tecidual mais organizada, com grande quantidade de tecido colágeno na região de perimísio, e pouca quantidade de tecido colágeno na região de endomísio (Figura 21C). No momento Tt houve um evidente aumento de tecido colágeno tanto na região de perimísio, quanto na região de endomísio, é notório o aumento da heterogenicidade das fibras musculares no Tt comparado com o momento T0 (Figura 21D).

Figura 21: Coloração Tricomo de Massom em corte de bíceps femoral do grupo controle

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Legenda: **A:** cão C1, momento Tt nota-se em azul deposição de tecido colágeno, células hipertrofiadas (*). Em **B:** cão C1, momento Tf nota-se em azul deposição de tecido colágeno. **C:** cão C2, momento T0 nota-se em azul deposição de tecido colágeno, células hipertrofiadas (*), porém, maior organização do tecido muscular. Em **D:** cão C2, Momento Tt nota-se em azul abundante deposição de tecido colágeno, e perda da estrutura muscular. Coloração Tricomo de Masson, aumento: 20x.

O cão E1 no momento T0 apresentou deposição de tecido colágeno na região do perimísio e epimísio, sendo mais abundante na região do perimísio. As células musculares dispostas de maneira organizada, com discreta heterogenicidade entre elas (Figura 22A). No momento Tf pode-se notar áreas com evidente diminuição de fibras musculares, aumento do espaço do endomísio e elevada heterogenicidade das células musculares (Figura 22B).

O cão E2 no momento T0 apresentou um depósito de tecido colágeno na região do perimísio e epimísio e discreta presença de depósito de colágeno na região do endomísio (Figura 22C). No momento Tt observado um discreto aumento da deposição de tecido colágeno no endomísio (Figura 22D). No

momento Tf notado uma diminuição da quantidade de tecido colágeno (Figura 22E).

O cão E4 no momento T0 apresentou evidente deposição de tecido colágeno nas regiões de perimísio e epimísio (Figura 22F). No momento Tt observado um adelgaçamento nos espaços preenchidos por tecido colágeno na região de perimísio, e ainda uma não deposição do tecido colágeno na região de endomísio (Figura 22G).

Figura 22: Coloração de Tricomo de Massom em corte de bíceps femoral do grupo experimental

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Legenda: **A:** cão E1, momento T0 nota-se em azul deposição de tecido colágeno, células hipertrofiadas (*), e maior organização do tecido muscular. Em **B:** cão E1, momento Tf nota-se em azul abundante deposição de tecido colágeno, e perda da estrutura muscular. **C:** cão E2, momento T0 nota-se em azul deposição de tecido colágeno. Em **D:** cão E2, momento Tt nota-se em azul a presença de tecido colágeno. Em **E:** cão E2, momento Tf nota-se o epimísio (e), e em azul deposição de tecido colágeno. **F:** cão E4, momento T0 nota-se em azul deposição de tecido colágeno, presença de células musculares hipertrofiadas (*). Em **G:** cão E4, momento Tt nota-se em azul a presença de tecido colágeno, células musculares hipertrofiadas (*). Coloração Tricomo de Masson, aumento: 20x.

6.6 MORFOMETRIA DAS CÉLULAS MUSCULARES

Após a contagem das células, realizamos a média de cada animal, média de cada tempo e a média do grupo nos diferentes tempos (Tabela 12). Uma vez que não obtivemos material em todos os tempos de coleta, algumas lacunas não estão preenchidas, tornando a média uma importante ferramenta. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados, controle e experimental, na análise morfométrica.

Tabela 12 - As médias da morfometria nos animais dos dois grupos, controle e experimental, nos diferentes tempos (São Paulo, 2012)

	T0	Tt	Tf	Média animal/grupo
2934		27	20	23,5
2997	95	32		63,5
2974	115		35	75
1936	89	38	34	53,7
1860	46	45		45,5
Média controles	95	29,5	20	48,2
Média experimentais	83,3	21,5	31,8	58,1

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Quando avaliado o número de fibras musculares o grupo controle apresentou uma perda muito significativa das fibras musculares entre o momento T0 e Tt ($p < 0,01$) no decorrer do período de avaliação do tratamento. Os animais experimentais apresentaram perda significativa das fibras musculares entre os momentos T0 e Tt ($p < 0,05$), sendo observado que a perda foi menor no grupo experimental quando comparado ao grupo controle. O grupo experimental no momento Tt apresentou maior número de fibras musculares quando comparado ao grupo controle, mas não foi considerado significativo. O grupo experimental

apresentou um maior número de fibras musculares, significativo, quando comparado ao grupo controle no momento Tf ($p < 0,01$) (Figura 23).

Figura 23: Médias das quantidades de fibras musculares nos grupos controle e experimental

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

6.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os fragmentos musculares foram submetidos a técnica de imunohistoquímica, com os seguintes marcadores: NFkbeta e TGF-beta, e então feita a quantificação da imunomarcção.

6.7.1 NF κ B

Uma vez que a ativação do NF κ B encontra-se envolvida com miopatias inflamatórias, marcamos nossos cortes histológicos de músculo dos dois grupos de cães, controle e experimental, com o intuito de verificar se o tratamento foi capaz de inibir esse fator, com o anticorpo NF κ B. A marcação com o NF κ B, foi positiva nos dois grupos, controle e experimental, porém, observamos menor porcentagem da expressão nos cães do grupo experimental quando comparado aos cães do grupo controle.

Em todas as figuras, há um corte de músculo de cão distrófico, sem a incubação do anticorpo primário, para mostrar a especificidade da marcação do anticorpo primário.

O cão C1 obteve no Tf, a expressão do NF κ B em diversas fibras do corte histológico, quando comparado com o músculo de cão distrófico controle negativo, é possível evidenciar com clareza a diferença na coloração acastanhada presente no citoplasma das células do cão C1 (Figura 24A). O cão C2 obteve no T0 (Figura 24B) e no Tt (Figura 24C), a expressão do NF κ B em diversas fibras do corte histológico, quando comparado com o músculo de cão distrófico controle negativo.

Figura 24: Imuno-histoquímica para detecção de NFkB em cortes de músculo bíceps femoral do grupo controle

Fonte: FERNANDES, R. A. 2012.

Legenda: A: cão C1, momento Tt com evidência expressão de NFkB. B: cão C2, no momento T0 com evidência da elevada expressão de NFkB: C: cão C2, no momento Tt permanecendo uma evidente expressão de NFkB. Insert em A e B: controle negativo. (*) células hipertrofiadas; (→) tecido conjuntivo abundante; (+) infiltrado inflamatório; círculo vermelho – marcação positiva Barra.= 100 µm

O cão E1 obteve no momento T0 (Figura 25A) e Tt (Figura 25B), evidente expressão de NFkB, quando comparados com o controle negativo. Na quantificação da marcação, observamos uma maior porcentagem de marcação no momento T0, comparado como momento Tt.

O cão E2 obteve expressão de NFkB, nos dois momentos T0 (Figura 25C) e Tt (Figura 25D), comparados com o controle. Evidenciada uma menor expressão no Tt comparado com o T0, no cão E2.

O cão E4 expressou o marcador NFkB nos dois momentos T0 (Figura 25E) e Tt (Figura 25F), que apesar de serem discretas marcações nos dois momentos, podemos afirmar que são marcações positivas quando são comparadas com o controle negativo. No momento Tt observamos uma menor expressão de NFkB quando comparado com o momento T0.

De alguma forma, o nosso coquetel medicamentoso, diminuiu a resposta inflamatória no tecido muscular esquelético, por uma menor expressão de NFkB nos animais experimentais. Ao realizarmos a quantificação do NFkB, através de uma porcentagem de marcação positiva, observamos que na média dos grupos, houve uma menor porcentagem de marcação nos momento Tt e Tt (Figura 26).

Figura 25: Imunohistoquímica para detecção de NFkB em cortes do músculo bíceps femoral do grupo experimental

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

Legenda: **A:** Cão E1, momento T0 com expressão de NFkB. **B:** Cão E1, momento Tt com menor expressão de NFkB. **C:** cão E2, momento T0 com evidente expressão de NFkB. **D:** cão E2, momento Tt com discreta diminuição da expressão de NFkB. **E:** cão E4, momento T0 com expressão de NFkB. **F:** cão E4, momento Tt com diminuição da expressão de NFkB. Insert F controle negativo. (*) células hipertrofiadas; (→) tecido conjuntivo abundante; (+) infiltrado inflamatório; círculo vermelho – marcação positiva Barra = 100 μm

Figura 26: Porcentagem de marcação positiva com o NFkB nos dois grupos estudados, controle e experimental

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

6.7.2 TGF- β 1

A expressão de TGF- β 1 está relacionado com o processo de fibrose nas fibras musculares. O TGF- β 1 foi imunomarcado nos dois grupos, controle e experimental. No grupo experimental, notamos uma menor porcentagem de expressão dessa citocina, quando comparado com o grupo controle, inferindo que o coquetel medicamentoso foi capaz de diminuir o processo fibrótico nos cães experimentais (Figura 29). Para o controle negativo, há um corte de músculo de cão distrófico, sem a incubação do anticorpo primário, para mostrar a especificidade da marcação do anticorpo primário.

A expressão de TGF- β 1 no cão C1 evidenciou forte marcação nos dois momentos, Tt (Figura 27A) e Tf (Figura 27B), quando comparados com o músculo

de cão distrófico para controle negativo. Um aumento da porcentagem de marcação, indica que houve um processo inflamatório progressivo neste cão 2934, o que é esperado pela curso natural da doença distrófica.

Assim como no cão C1, o cão C2, expressou fortemente o TGF- β 1 nos momentos T0 (Figura 27C) e Tt (Figura 27D), com uma marcação distribuída em todo o corte histológico, quando comparados com o músculo de cão distrófico para controle negativo. Ocorreu um aumento da porcentagem de marcação no Tt, sugerindo que a resposta inflamatória aumentou.

Figura 27: Imunohistoquímica para detecção de TGF- β 1 em cortes do músculo bíceps femoral do grupo controle

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

Legenda: **A:** cão C1, momento Tt com forte expressão de TGF- β 1 em endomísio das fibras musculares. **B:** cão C1, momento Tf com menor expressão de TGF- β 1. **C:** cão C2, momento T0 com forte expressão de TGF- β 1 em endomísio e perimísio das fibras musculares. **D:** cão C2, momento Tt com aumento da forte expressão de TGF- β 1 em endomísio e perimísio das fibras musculares. Insert C controle negativo. (*) células hipertrofiadas; (→) tecido conjuntivo abundante; (+) infiltrado inflamatório; círculo vermelho – marcação positiva Barra = 100 μ m.

O cão E1 expressou o TGF- β 1 nos dois momentos T0 e Tf, quando comparados com o músculo de cão distrófico controle negativo. No momento T0

(Figura 28A), houve uma marcação principalmente em região de perimísio, podendo sugerir um início de resposta inflamatória. No momento Tf (Figura 28B) houve uma expressão de TGF- β 1 tanto na região de perimísio quanto na região de endomísio. Não temos material no Tt, por isso não podemos afirmar neste animal, se houve uma melhora na resposta inflamatória, durante o coquetel medicamentoso. Porém, quando quantificada a porcentagem de marcação, no momento Tf houve menor expressão, comparado com o momento T0.

O cão E2 expressou o TGF- β 1 em todos os momentos T0 (Figura 28C), Tt (Figura 28D) e Tf (Figura 28E), quando comparado com o músculo de cão distrófico controle negativo. A expressão do TGF- β 1 foi menor nos momentos Tt e Tf, comparados com o T0.

O cão E4 expressou o TGF- β 1 em todos os momentos T0 e Tt, quando comparado com o músculo de cão distrófico controle negativo. Antes do tratamento (T0) a expressão foi mais evidente em região de perimísio (Figura 28F), e durante o tratamento além da expressão em região de perimísio, expressão na região de endomísio (Figura 28G). Quando realizada a porcentagem de expressão, notamos que no momento T0 há maior expressão, quando comparada com o momento Tt

Esses dados nos sugerem que igualmente aconteceu com a marcação do NF κ B, o TGF- β 1, diminuiu durante o tratamento e quando comparado com o grupo controle, sendo esse um resultado benéfico do nosso coquetel medicamentoso.

Figura 28: Imunohistoquímica para detecção de TGF- β 1 em cortes do músculo bíceps femoral do grupo experimental

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012

Legenda: **A:** cão E1, momento T0 com expressão de TGF- β 1 em perimísio das fibras musculares. **B:** cão E1, momento Tf com aumento da forte expressão de TGF- β 1 em endomísio das fibras musculares. **C:** cão E2, momento T0 com marcada expressão de TGF- β 1 em endomísio das fibras musculares. **D:** cão E2, momento Tt com discreta diminuição da expressão de TGF- β 1 em endomísio das fibras musculares. **E:** Momento Tf com aumento da expressão de TGF- β 1 em endomísio e perimísio. **F:** cão E4, momento T0 com marcada expressão de TGF- β 1 em perimísio das fibras musculares. **G:** cão E4, momento Tt com aumento da expressão de TGF- β 1 em endomísio e perimísio das fibras musculares. (*) células hipertrofiadas; (→) tecido conjuntivo abundante; (+) infiltrado inflamatório; círculo vermelho – marcação positiva Insert G controle negativo. Barra = 100 μ m

Figura 29: Porcentagem de marcação positiva com o TGF-B nos dois grupos estudados, controle e experimental.

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

6.7.3 Distrofina

Utilizamos o anticorpo para a distrofina nos cortes histológicos dos cães tratados e controles em T0, Tt e Tf, bem como em amostras histológicas de cães saudáveis para avaliação da validade do teste. Pelos resultados observados nos cortes histológicos de músculo, em todos os animais dos dois grupos estudados, verificamos a ausência da marcação da distrofina na membrana sarcoplasmática em ambos os grupos estudados. No músculo de cães saudáveis, nota-se imunomarcação positiva, com marcação no sarcolema das fibras musculares, indicando que o teste foi válido para a marcação da distrofina (Figura 30).

Figura 30: Imunohistoquímica para detecção de distrofina em cortes do músculo bíceps femoral do grupo experimental

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

Legenda: **A:** cão C1, no momento Tt. **B:** cão C1, no momento Tf. **C:** cão C2, no momento T0. **D:** cão C2, no momento Tt. **E:** cão E1, momento T0. **F:** : cão E1, momento Tf. **G:** cão E2, momento T0. **H:** cão E2, momento Tt. **I:** cão E2 no momento Tf. **J:** cão E4, momento T0. **L:** cão E4, momento Tt. Insert A, E e L controle positivo. Em nenhuma amostra é possível evidenciar a marcação positiva para distrofina. (*) células hipertrofiadas; (→) tecido conjuntivo abundante; (+) infiltrado inflamatório; círculo vermelho – marcação positiva Barra = 100 µm

6.8 qRT PCR

Os resultados do qRT-PCR estão divididos por animal experimental, sendo que cada animal experimental está sendo comparado com a média do grupo controle, nos diferentes momentos de coleta (T0, Tt e Tf). Os seguintes genes foram analisados: distrofina, miostatina, utrofina, TGF-beta, TNF-alfa e VEGF.

Cão experimental E1

Conforme pode-se observar na figura 31 a expressão da distrofina no momento T0 foi maior, já no momento Tf, a expressão foi marcadamente menor; a expressão da miostatina foi maior nos dois momentos da avaliação, T0 e Tf; a expressão da utrofina no momento T0 foi significativamente maior, porém no momento Tf, a expressão foi menor; a expressão do TGF β no momento T0 foi aproximadamente 2x maior e momento Tf, a expressão foi menor; a expressão do TNF α no momento T0 e Tf foi discretamente maior; a expressão do VEGF no momento T0 foi 2x maior, enquanto no momento Tf, a expressão foi aproximadamente 3x menor.

Todas essas amostras apresentaram estes resultados quando comparadas com o grupo controle, nos respectivos momentos.

Figura 31: Expressão dos genes distrofina, miostatina, utrofina, TGF-beta, TNF-alfa e VEGF, no grupo controle e animal experimental E1

Fonte: FERNANDES, R.A.2012

Cão experimental E2

Conforme pode-se observar na figura 32, a expressão da distrofina no momento T0 foi semelhante ao grupo controle no mesmo momento, já no momento Tt, a expressão foi marcadamente menor; a expressão da miostatina foi maior no momento T0 da avaliação, e no momento Tt foi semelhante; a expressão da utrofina no momento T0 foi maior, porém no momento Tt, a expressão foi menor; a expressão do TGF β no momento T0 foi aproximadamente 2x maior e no momento Tt, a expressão foi maior; a expressão do TNF α foi marcadamente maior nos momento T0 e Tt; a expressão do VEGF foi menor nos momento T0 e Tt.

Todas essas amostras apresentaram estes resultados quando comparadas com o grupo controle, nos respectivos momentos.

Figura 32: Expressão dos genes distrofina, miostatina, utrofina, TGF-beta, TNF-alfa e VEGF, no grupo controle e animal experimental E2

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

Animal E4

Conforme pode-se observar na figura 33, a expressão da distrofina nos 3 momentos, T0, Tt e Tf, nota-se que no momento Tt, esse valor é significativamente menor no E4; a expressão da miostatina foi maior nos momentos T0 e Tt da avaliação, e no momento Tt foi semelhante, ao grupo controle; a expressão da utrofina no momento T0 e Tt foi menor, sendo que no momento T0 foi discretamente menor, já no momento Tf a expressão nos dois grupos, é semelhante; a expressão do TGF β no momento T0 foi maior, no momento Tt e Tf, a expressão foi marcadamente menor; a expressão do TNF α foi aparentemente ausente no momento T0, maior no momento Tt, menor no momento Tf; a

expressão do VEGF foi discretamente maior no momento T0, e menor nos momentos Tt e Tf.

Todas essas amostras apresentaram estes resultados quando comparadas com o grupo controle, nos respectivos momentos.

Figura 33: Expressão dos genes distrofina, miostatina, utrofina, TGF-beta, TNF-alfa e VEGF, no grupo controle e animal experimental E4

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

Os dados foram normalizados pela média da expressão dos transcritos dos animais normais (N 12 e 13) em razão do endógeno GAPDH canino (Figura 34).

Figura 34: Expressão dos genes distrofina, miostatina, utrofina, TGF-beta, TNF-alfa e VEGF, no grupo controle e experimental

Fonte: FERNANDES, R.A. 2012.

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

É importante ressaltar que pela primeira vez é realizada essa associação de medicamentos, por um tempo prolongado em modelo experimental, para tratar a Distrofia Muscular de Duchenne. Desta forma, a discussão baseia-se na comparação com outros estudos medicamentosos neste modelo e com os diferentes achados entre nossos grupos controle e experimental. Ao serem utilizadas diversas metodologias para avaliar os resultados deste trabalho, analisaremos cada uma delas separadamente visando comparar os efeitos desta associação de medicamentos no tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne em modelo canino.

Assim, relativamente a bioquímica sérica, observamos no T0, Tt e Tf nos dois grupos, aumento das enzimas séricas CK e ALT. O aumento da concentração sérica de ALT está relacionada com lesões hepáticas ou musculares (BUSH, 2004; MEYER; COLES; RICH, 1995). A CK está localizada na musculatura esquelética, cardíaca e no cérebro, assim, a sua dosagem contribui para diagnósticos de lesões musculares (BUSH, 2004). Desta forma, nossos resultados confirmam os achados de Valentine et al (1990) e Bergmam et al (2002), que afirmam que cães distróficos de qualquer idade, apresentam aumento dessas enzimas.

De acordo com Silva (2009) a administração de Losartana Potássica não alterou a concentração das enzimas CK e ALT. Achados semelhantes foram observados por Cohn et al (2007) com a administração de bloqueadores para receptores de angiotensina II em *mdx*. Adicionalmente, Araújo (2009) observou após tratamento de cães GRMD com idades variando entre 4 e 6 meses, e administração de bortezomibe por 9 semanas, um aumento sérico destas enzimas. A diminuição sérica de CK pode sugerir evidências bioquímicas e funcionais de uma melhora da função muscular em cães GRMD (BOGDANOVICH et al, 2002). Em nosso estudo, se compararmos os grupos controle e experimental, notamos que a CK e a ALT de todos os animais permanecem altas, porém, há uma menor diferença estatística no grupo experimental, pois o aumento

foi menos acentuado para os cães que receberam o coquetel. Isto nos faz inferir que o coquetel possa ter reduzido a lesão muscular.

A mesma observação pode ser relatada com relação a presença da leucocitose nos grupos estudados. Nossos achados revelaram a presença de leucocitose com neutrofilia, sem desvio a esquerda, alterações essas já relatadas por Kerkis et al (2008) e Valentine et al (1990). Esses achados podem estar relacionados com a ocorrência do processo inflamatório (MEYER; COLES; RICH, 1995; NELSON; COUTO, 2006). Relativamente aos animais pertencentes ao grupo experimental, apenas um animal apresentou leucocitose. É notável o aumento dos leucócitos nos dois grupos, porém o aumento dos leucócitos não foi significativo no grupo experimental, já no grupo controle, foi um aumento significativo, o que nos faz mais uma vez inferir que o coquetel medicamentoso pode ter promovido uma redução ou uma menor resposta inflamatória durante o período do tratamento. Estudos com uso de bortezomibe, revelaram a permanência da leucocitose durante a sua administração (ARAÚJO, 2009).

Notou-se a ocorrência de trombocitose em cinco dos seis animais avaliados. Alterações semelhantes também foram evidenciadas por Araújo (2009). Segundo Bush (2004) quadros de trombocitose podem ser observados em animais com processos inflamatórios agudos ou crônicos. Além disso, a trombocitose pode estar relacionada com a deposição de colágeno no tecido (MEYER; COLES; RICH, 1995).

Com relação à avaliação histopatológica pela coloração de Hematoxilina Eosina e Tricomo de Masson, os fragmentos de tecido dos cães distróficos não apresentaram fibras musculares uniformemente espaçadas, angulares, relativamente do mesmo tamanho, multinucleadas, núcleos localizados na periferia das fibras, como relatado em estrutura muscular normal de um cão saudável (BANKS, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SAMUELSON, D. A, 2007). Nos dois grupos, controle e experimental, e em todos os tempos, observou-se aumento de tecido conjuntivo e colágeno, presença de células musculares hipertrofiadas, além de infiltrado inflamatório. O mesmo foi observado e descrito por Lui et al (2004), quando tratou cão GRMD por 4 meses com prednisona, e

observou efeitos deletérios a musculatura, mediante análise de cortes histopatológicos. Ainda que houvesse uma melhora da força muscular, o tratamento seria inviável a longo prazo, já que poderiam haver severos danos ao tecido muscular.

Adicionalmente, observamos nos dois grupos, um aumento significativo de deposição de tecido colágeno. De acordo com Valentine et al (1986) e Nguyen et al (2002) tecidos destruídos por lesão inflamatória ou traumática são substituídos por tecido conjuntivo, tentando recompor a integridade estrutural do músculo, porém nem sempre há melhora funcional. Isto demonstra que nossos animais continuavam a sofrer lesão progressiva durante o tratamento, nos dois grupos estudados.

Portanto, nas técnicas histopatológicas utilizadas, não pudemos observar nenhuma melhora morfológica entre os dois grupos estudados, controle e experimental.

A técnica de imunohistoquímica permitiu avaliar a expressão dos anticorpos NF-K β e TGF- β . A expressão do NF-K β foi relativamente menor no grupo experimental comparado com o grupo controle. Este resultado era esperado, pois o NF-K β tem função importante na resposta imune inflamatória pela regulação de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimento, indução de enzimas como a ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintetase (iNOS) (KARIN; 2000; LAWRENCE et al, 2001; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001; ELLIOT et al, 2003). Checker et al (2012) usou o ácido ursodesoxicólico como potente mediador inflamatório, e observou uma diminuição de NF-kbeta em camundongos após transplante autólogo, sugerindo o uso do ácido ursodesoxicólico em desordens inflamatórias.

Monici et al (2003); Messina et al (2006) revelam que o NFkBeta tem elevada expressão nas distrofias musculares, o que corrobora com nossos achado. Por outro lado, Cai et al (2004) citam que esta elevada expressão ocorre em situações de atrofia e fraqueza muscular.

Kumamoto et al (1997) estudou a musculatura de pacientes com DMD, e notou uma intensa expressão imuno-histoquímica para NF-K β , observada em

fibras atroficas, necróticas e em regeneração, aparecendo primariamente em áreas de infiltrado inflamatório.

Um dos fatores que promoveram um início prematuro do tratamento com o coquetel medicamentoso de nossos cães foi a intenção de inibir a ação do NF- κ B em estágios iniciais da distrofia muscular, pois segundo Acharyya et al (2007) a inibição do mesmo pode reduzir a inflamação e diminuir a exaustão inicial da capacidade regenerativa no músculo distrófico. O uso contínuo do coquetel poderia causar a inibição contínua do NF- κ B permitindo a recuperação e início do reparo muscular em fases tardias da doença. Desta forma, o uso de ferramentas que promovem a inibição gradativa e contínua do NF-Kbeta teria papel importante nas doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas.

A expressão da proteína TGF-beta1 foi significativamente maior no grupo controle, quando comparada com o grupo experimental. Estes achados nos mostram que os animais que receberam o coquetel de medicamentos tiveram uma menor proliferação de tecido conjuntivo. Segundo Bernasconi et al (1995) que estudou músculo de pacientes distróficos, o TGF-B1 e outras citocinas, são liberadas após processos de necrose e inflamação muscular em tecidos musculares em degeneração devido ausência de distrofina. O TGF- β 1 liberado pode desencadear a ativação da matriz extracelular levando a proliferação do tecido conjuntivo comprometendo a regeneração muscular devido ao processo fibrótico instalado. O autor ainda cita que a imunomarcagem em DMD em ramos de tecido conjuntivo fibroso em perimísio e endomísio, enquanto nos músculos normais não observou marcação positiva. Obtivemos a mesma imunomarcagem nos músculos de cães distróficos.

Silva (2009) tratou cães GRMD com Losartana Potássica e observou uma menor expressão de TGF- β 1 nos músculos ao final do tratamento quando comparadas com a biópsia muscular coletada antes do tratamento. A Losartana Potássica foi um dos medicamentos usados em nosso coquetel, e, portanto esperávamos resultado semelhante.

Na técnica de imunohistoquímica, não foi possível a observação de marcação positiva para distrofina, por esse dado, sugeríamos que nas nossas

amostras, tanto do grupo controle, quanto do grupo experimental, a marcação foi ausente. Já na técnica de qRT-PCR, com fragmentos dos mesmos animais nos mesmos momentos de coleta, foi possível observar que o gene da distrofina, é expresso na musculatura desses animais. A expressão da distrofina nos grupo experimental, somente foi maior do que no grupo controle, no momento T0 de um dos animais experimentais, o animal E1. A expressão ou não da distrofina é relatada por diferentes autores, de formas diferentes. Serra et al (2012) refere como uma falta de distrofina, Bartlett et al (2000) discute a mutação, porém, diz que é possível observar a presença da distrofina. Hanft et al (2007) define a mutação como uma perda da distrofina.

Nós observamos que dependendo da técnica utilizada para detectar a presença ou ausência da distrofina, podemos cometer alguns erros, pois na técnica de imunohistoquímica, no nosso experimento, inferimos a ausência da marcação de distrofina, já na técnica de qRT-PCR é nítida a presença dessa proteína no músculo distrófico, dos dois grupos, desta forma não podemos associar a presença da distrofina com o tratamento proposto, mas é importante ressaltar o uso da técnica de qRT-PCR, como uma ferramenta mais precisa na avaliação da distrofina.

A miostatina é um regulador negativo do crescimento do músculo esquelético (Kornegay et al, 2012), por isso vêm sendo amplamente estudada na tentativa de que sua inibição provocaria uma hipertrofia muscular (KORNEGAY et al, 2012; WASH; CELESTE, 2005; BOGDANOVICH, 2005; ZANOTTI; GIBERTINI; MORA, 2010; BISH et al, 2011). Segundo Wash e Celeste (2005), a inibição da miostatina pode levar não só a uma hipertrofia como também, uma hiperplasia das células musculares.

Bish et al (2011), introduziu genes em modelo GRMD, que inibem a miostatina, e com isso, notou um aumento significativo de massa muscular nos animais tratados, em comparação com seu grupo controle. Uma maior quantidade de miostatina no momento T0 de nossas avaliações, foi evidente nos dois grupos estudados, e depois esses valores tenderam a diminuir, sem a aparente interferência do tratamento. Desta forma podemos inferir que animais filhotes, pois

no momento T0 os animais estavam com 3 meses de vida, tem uma maior expressão de miostatina no músculo esquelético, e que ela diminui com o passar do tempo. E ainda, que essa diminuição na expressão, não trouxe hiperplasia, nem mesmo hipertrofia na musculatura dos animais, dos dois grupos experimental e controle. Pelos estudos citados acima, para que haja inibição da miostatina, é necessário técnicas terapêuticas com vetores e/ou anticorpos que hajam no sítio da produção da miostatina, o que não ocorreu com o nosso tratamento medicamentoso.

Os autores Zanotti, Gilbertini e Mora (2010) estudaram a expressão da miostatina em fibroblasto de pacientes humanos distróficos tratados *in vitro* com TGF β e observaram que a miostatina diminui com aumento do TGF β , essas informações corroboram com nossos resultados, pois observamos a expressão do TGF β , e então, a menor expressão da miostatina pode estar relacionada com a fibrose.

A utrofina é homóloga a distrofina e interage com a distroglicana e o subcomplexo sarcoglicana-sarcospan para formar o complexo utrofina-glicoproteína, aonde a utrofina substitui a função da distrofina (MARSHALL et al, 2012). No modelo de peixe para distrofia, o *zebrafish*, a distrofina foi expressa durante a miogênese, enquanto a utrofina, expressa, em todo o organismo do animal (LAI, et al, 2011).

Segundo Tinsley et al (2011), existe evidência significativa demonstrando que o aumento dos níveis da proteína relacionada a distrofina, a utrofina, em modelos *mdx* resulta em utrofina vinculada ao sarcolema, impedindo a doença distrofia muscular. O autor desenvolveu uma pequena molécula, a SMTc1100, similar a utrofina, a qual aumenta seus níveis no músculo, e consequentemente, diminuiu os efeitos nocivos da doença no *mdx*, considerando essa, uma potência terapêutica. Por esse e outros estudos com a expressão da utrofina, desejávamos que com o coquetel medicamentoso proposto em nosso trabalho, tivesse como um dos efeitos esperados, a maior expressão dessa proteína, a utrofina.

Nossos resultados mostram que a utrofina não teve expressão significativa entre os grupos, e entre os momentos no mesmo animal, exceto o animal E4, que

teve um discreto aumento da expressão, entre o T0 e Tt, porém, no Tf, não houve a expressão, nos sugerindo que neste animal, o coquetel pudesse ter causado um aumento da expressão da utrofina, e com o término do tratamento, essa expressão se igualou a zero. Gordon, Diaz e Kostek (2012), estudaram os efeitos do Resveratrol em modelo murino, o *mdx*, e observaram uma diminuição da inflamação e aumento da expressão da utrofina, ambas as técnicas realizadas pelo RT-PCR. A diminuição da inflamação foi avaliada pela dosagem de Interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , porém, não houve diminuição do TNF- α , apenas da IL-6, e ainda assim, eles inferem ter diminuído a inflamação com o tratamento proposto. Marshall et al (2012) introduziu *sarcospan* em *mdx*, e revelou uma melhora na regeneração muscular nos animais, por uma consequência da melhor sinalização de Akt e com isso ocorre uma melhor interação de distroglicana e utrofina, aumentando a expressão da utrofina. Esses estudos mostram respostas benéficas com o aumento da expressão da utrofina em modelo *mdx*, no nosso estudo, em modelo GRMD, não foi possível observar esse aumento da expressão em nossos animais experimentais, e o animal experimental E4 no qual houve um discreto aumento com o tratamento, não mostrou melhora clínica, assim como os outros animais estudados, tanto do grupo experimental quanto do grupo controle.

A desorganização estrutural e extensa remodelação que caracterizam o processo fibrótico, envolve um desequilíbrio de metaloproteinases de matriz e a seus inibidores teciduais específicos, e a liberação de citocinas fibrogênicas incluindo TGF- β 1 (MAUVIEL, 2005). TGF- β 1 é um membro da família TGF- β e é um regulador negativo do crescimento endógeno muscular. Ele é homólogo a miostatina e induz diversos efeitos similares nos músculos, incluindo a inibição da proliferação e diferenciação de células precursoras de músculo, e estimulação da fibrose (FAKHFAKH et al, 2012). Por isso avaliamos a sua expressão nos nossos dois grupos, controle e experimental. Obtivemos valores menores nos grupos experimentais quando comparados com o controle, sendo esse um resultado benéfico com o uso do coquetel medicamentoso, pois de alguma forma, ele inibiu o processo fibrótico na musculatura dos animais.

Fakhfakh et al (2012) avaliou os efeitos do uso de Losartana em culturas de mioblastos humanas, e notou que houve um aumento na proliferação e fusão dos mioblastos e uma diminuição na apoptose. Conclui que o bloqueio do sinal de TGF- β com o tratamento com losartan melhora o sucesso de transplante de mioblastos provavelmente, aumentando a proliferação de mioblastos e fusão, diminuindo a ativação de macrófagos, e mudando a expressão de fatores reguladores miogênicos.

Dentre os sete medicamentos usados em nosso coquetel, o losartan era um deles, e já esperávamos o resultado obtido, que durante o tratamento a expressão do TGF β 1 diminuiria.

Pasquale et al (2012) avaliaram a expressão do TNF α em músculo humano distrófico comparado com outra doença inflamatória, a dermatomiosite juvenil, e notaram que o TNF α , é muito mais expresso na DMD, sendo esse um importante fator inflamatório.

Nos animais experimentais, não houve uma diminuição no momento Tt, em que os animais recebiam o tratamento, já no momento Tf, essa citocina teve uma menor expressão, em apenas um animal experimental, nos levando a acreditar que o tratamento proposto, não promoveu uma diminuição na expressão dessa citocina inflamatória. Gordon, Diaz e Kostek (2012), estudaram o resveratrol, e obtiveram resultados positivos com uma melhora na musculatura no *mdx*, porém, na dosagem do TNF α , não notaram diferenças em sua expressão, assim como sugerimos ter ocorrido em nosso estudo.

O VEGF parece ser o fator central no processo da angiogênese no músculo esquelético (WILLIAMS; ANNEX, 2004; BLOOR, 2005). O VEGF pode ser estimulado também por outros fatores incluindo oxido nítrico, angiotensina II e metabólitos do ácido aracdônico (Amaral et al, 2008). Quando os níveis de VEGF estão baixos no músculo esquelético ocorre uma diminuição da densidade capilar e da relação de capilares por fibra muscular, acompanhado pelo aumento de apoptose destas células (GALE; YANCOPOULOS, 1990).

Em nossos resultados observamos diminuição na expressão de VEGF nos animais tratados com o coquetel, comparados com o grupo controle. Podemos

associar essa diminuição com o uso da Talidomida em nosso coquetel, que exerce função anti-angiogênica, por bloqueio do VEGF, e ainda em estudo com células humanas, a Talidomida bloqueia o $\text{TNF}\alpha$ e o $\text{NF}\kappa\beta$ (RAFFIIEE et al, 2010), corroborando parcialmente com os nossos resultados no grupo experimental.

8 Conclusões

8 CONCLUSÕES

- O coquetel de medicamentos (Sildenafil, Ácido Ursodesoxicólico, Acetilcisteína, Talidomida, Losartana Potássica, Diltiazem, Micofenolato de Mofetila) é viável, uma vez que não apresentou toxicidade após avaliação física e laboratorial aos animais tratados
- O coquetel de medicamentos (Sildenafil, Ácido Ursodesoxicólico, Acetilcisteína, Talidomida, Losartana Potássica, Diltiazem, Micofenolato de Mofetila) parece ter algum efeito na degeneração muscular, pois houve uma diminuição de TGP e CK no grupo experimental quando comparado ao grupo controle
- Houve uma diminuição da leucocitose nos animais experimentais, sugerindo uma diminuição do processo inflamatório
- Pela técnica de morfometria das fibras musculares, notamos perda de massa muscular menor no grupo experimental
- A marcação imunohistoquímica de TGF- β 1 e NF κ B foi menor no grupo experimental, quando comparado com o grupo controle, indicando diminuição na expressão de mediadores inflamatórios
- A expressão de VEGF e TGF β 1 através da técnica de qRT-PCR foi menor no grupo experimental, o que demonstra o efeito esperado dos medicamentos
- A avaliação dos genes pelo qRT-PCR é uma importante ferramenta nos testes pré-clínicos para DMD, por ser um resultado preciso e de baixo custo

- A ação conjunta dos medicamentos, conseguiu agir em diferentes pontos deletérios da doença, a distrofia muscular, pois diminuiu a perda de fibras musculares, conseqüentemente, inibindo mediadores inflamatórios

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 207-234.

ABDEL-SALAM, E.; ABDEL-MEQUID, I.; KORRAA, S. S. Markers of degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v. 28, n. 3, p. 94-100, 2009.

ABREU, D. K. **Padronização do perfil hematológico, bioquímico, proteinograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados epal distrofia muscular**. 158f. Dissertação “Mestrado em Ciências”. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ACHARYYA, S.; SHARMA, S. M.; CHENG, A. S.; LADNER, K. J.; HE, W.; KLINE, W.; WANG, H.; OSTROWSKI, M. C.; HUANG, T. H.; GUTTRIDGE, D. C. TNF Inhibits Notch-1 in Skeletal Muscle Cells by Ezh2 and DNA Methylation Mediated Repression: Implications in Duchenne Muscular Dystrophy. **Plos One**. v. 5, p. 1-9, 2010.

ALLEN, D. G. Echocardiography as a research and clinical tool in veterinary medicine. **Canadian Veterinary Journal**. v. 23, n. 11, p. 313-316, 1982.

AMARAL, S.L.; SANCHEZ, L.S.; CHANG, A.J.B.A.; ROSSONI, L.V.; MICHELINI, L.C. Time course of training-induced microvasculatory changes and of VEGF expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 41, p. 424-431, 2008

ANSVED, T. Muscular dystrophies: influence of physical conditioning on the disease evolution. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 6, p. 435-439, 2003.

ARAUJO, K. P. C. **Uso de borteomibe (PS-K341) em cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD)- Viabilidade da terapia e reestruturação da distrofina muscular**. 2009. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ASCAH, A.; KHAIRALLAH, M.; DAUSSIN, F.; BOURCIER-LUCAS, C.; GODIN, R.; ALLEN, B. G.; PETROF, B. J.; DES ROSIERS, C.; BURELLE, Y. Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*, v. 300, p. 144–153, 2011.

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

BÁNYÁSZ, I.; SZABÓ, S.; BOKODI, G.; VANNAY, A.; VÁSÁRHELYI, B.; SZABÓ, A.; TULASSAY, T.; RIGÓ, J. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pré-eclampsia. **Mol. Hum. Reprod.**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 233-236, 2006.

BARNES, P.; KARIN, M. Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. **The New England Journal of Medicine**. v. 336, p. 1066–1071, 1997.

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 of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 255-261, 2002.

BERNARDES-SILVA, C. F.; DAMIAO, A. O. M. C.; SIPAHI, A. M.; LAURINDO, F. R. M.; IRIYA, K.; LOPASSO, F. P.; BUCHPIGUEL, C. A.; LORDELLO, M. L. L. C.; AGOSTINHO, C. L. O.; LAUDANNA, A. A. Ursodeoxycholic acid ameliorates experimental ileitis counteracting intestinal barrier dysfunction and oxidative stress. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 49, n. 10, p. 1569–1574, 2004.

BERNASCONI, P.; TORCHIANA, E.; CONFALONIERI, P.; MORANDI, L.; BRUGNONI, R.; BARRESI, R.; MORA, M.; CORNELIO, F.; MANTEGAZZA, R. Expression of transforming growth factor-beta1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis: pathogenetic role of fibrogenic cytokines. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 96, p. 1137– 1144, 1995.

BEUERS, U. Drug insight: mechanisms and sites of action of ursodeoxycholic acid in cholestasis. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. v. 3, p. 318–28, 2006.

BLAKE, D. J.; WEIR, A.; NEWHEY, S. E.; DAVIES, K. E. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. **Physiological Reviews**. v. 82, p. 291-329, 2002.

BLAKE, D. J.; HAWKES, R.; BENSON, M. A.; BEESLEY, P. W. Different dystrophin-like Complexes are expressed in neurons and glia. **The Journal of Cell Biology**. v.147, n. 3, p. 645-658, 1999.

BLOOR, C.M. Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis*. v. 8, p. 263-271, 2005.

BOOLELL, M.; ALLEN, M. J.; BALLARD, S. A.; GEPI-ATTEE, S.; MUIRHEAD, G. J.; NAYLOR, A. M.; OSTERLOH, I. H.; GINGELL, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **International journal of impotence research**, v. 8, n. 2, p. 47-52, 1996.

BONAGURA, J. D. Echocardiography. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 4, p. 516-522, 1994.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis. **The New England Journal of Medicine**. v. 331, p. 1286–1292, 1994.

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.

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

CAMPBELL, C.; JACOB, P. Deflazacort for the treatment of Duchenne dystrophy: a systematic review. **BioMed Central Neurology**. v. 3, p. 7, 2003.

CAROMANO, F. A. Características do Portador de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD): Revisão. **Arquivos de ciências da saúde da UNIPAR**. v. 3, n. 3, p. 211-218, 1999.

CHECKER, R.; SANDUR, S. K.; SHARMA, D.; PATWARDHAN, R. S.; JAYAKUMAR, S.; KOHLI, V.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B.; SAINIS, K. B. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. **PLoS One**. V. 7, n. 2, p.3131-8, 2012.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; SULLIVAN, M. J.; KORNEGAY, J. N. Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**. v. 80, v.3 p. 175-181, 2001.

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

CHIU, W. C.; LAI, Y. P.; CHOU, M. Y. Humanization and Characterization of an Anti-Human TNF- α Murine Monoclonal Antibody. **PLoS ONE**. v. 6, n.1, 2011.

CHRIST, D. D.; WONG, P. C.; WONG, Y. N.; HART, S. D.; QUON, C. Y.; LAM, G. N. The pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium (DuP 753/MK 954) in the dog. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutica**. v. 268, p. 1199-1205, 1994.

COHN, R. D.; ERP, C.; HABASHI, J. P.; SOLEIMANI, A. A.; KLEIN, E. C.; LISI, M. T.; GAMRADT, M.; RHYS, C. M.; HOLM, T. M.; LOEYS, B. L.; RAMIREZ, F.; JUDGE, D. P.; WARD, C. W.; DIETZ, H. C. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. **Nature Medicine**. v. 13, n. 2, p. 204 – 210, 2007.

COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve** v. 23, p. 1456–1471, 2000.

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.

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

COULTON, G. R.; MORGAN, J. E.; PARTRIDGE, T. A.; SLOPER, J. C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy. I. A histological, morphometric and biochemical investigation. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. v. 14, n. 1, p. 10-53, 1988.

CUI, W.; FAN, Y.; WU, W.; WANG, J.; NI, A. Expression of lymphocytes and lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. **Clinical Infectious Disease**, v. 37, p. 857-859, 2003.

DAVIES, K. E. Challenges in Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**. v. 7, p. 482-486, 1997.

DE PASQUALE L.; D'AMICO, A.; VERARDO, M.; PETRINI, S.; BERTINI, E.; DE BENEDETTI, F. Increased muscle expression of interleukin - 17 in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**. v. 78, n. 17, p.1309-1314, 2012.

DECONINCK, N.; DAN, B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **Pediatric Neurology**. v. 36, p. 1-7, 2007.

DEMOS, J. Results of the treatment of Duchenne de Boulogne myopathy by early physiotherapy. A comparative study with untreated subjects. **Archives françaises de pédiatrie**. v. 40, p. 609-613, 1983.

DHINGRA, S.; SHARMA, A. K.; ARORAL, R. C.; SLEZA, J.; SINGAL, P. K. IL-10 attenuates TNF- α -induced NF κ B pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. **Cardiovascular Research**. v. 82, p. 59-66, 2009.

DOGRA, C.; SRIVASTAVA, D. S.; KUMAR, A. Protein-DNA Array-based Identification of Transcription Factor Activities Differentially Regulated in Skeletal Muscle of Normal and Dystrophin-deficient Mdx Mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 312, p. 17–24, 2008.

DROUARD-HAELEWYN, C. Évaluation du fonctionnement myocardique par échographie: réalisation pratique et intérêt chez les carnivores domestiques. **Prat Méd Chir Anim Comp**, v.33, p. 47-59, 1998.

EDWARDS, N .J. Bolton's handbook of canine and feline electrocardiography. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 28, n. 12, p. 776, 1987.

ERAZO-TORRICELLI, R. Actualización en distrofias musculares. **Revista de Neurologia**. v. 39, p. 860-871, 2004.

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

EMERY, A. E. The muscular dystrophies. **Lancet**, v. 359, p. 687-695, 2002.

ETTINGER, S. J. Cardiac arrhythmias diagnosis and treatment. In: ETTINGER, E. BONAGURA, E. *Os recentes avanços da cardiologia veterinária*, São Paulo: Anais Ettinger e Bonagura. SP, 1997.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med.**, New York, v. 9, n. 6, p. 669-76, 2003

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 161, n. 2, p. 851-8, 1989.

GALE, N.W.; YANCOPOULOS, G.D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & Development*. v.13, p. 1055–1066, 1999.

GILBERT, R.; NALBANTOGLU, J.; PETROF, B. J.; EBIHARA, S.; GUIBINGA, G. H.; TINSLEY, J. M.; KAMEN, A.; MASSIE, B.; DAVIES, K. E.; KARPATI, G.

Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the Dystrophic phenotype of mdx mouse muscles. **Human Gene Therapy**. v. 10, n. 8, p. 1299–1310, 1999.

GOSSELIN, L. E.; MCCORMICK, K. M. Targeting the immune system to improve ventilatory function in muscular dystrophy. **Medicine Science in Sports and Exercise** v. 36, p. 44–51, 2004.

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

GROUND, M. D.; DAVIES, M.; TORRISI, J.; SHAVLAKADZE, T.; WHITE, J.; HODGETTS, S. Silencing TNFalpha activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anticytokine drugs in mice. **Cell and Tissue Research**. v. 320, p. 509–515, 2005.

GUIMARÃES, A. C.; MALACHIAS, M. V. B.; COELHO O. R.; ZILLI, E. C.; LUNA, L. R. Uso do Sildenafil em Pacientes com Doença Cardiovascular. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v 73, n 6, p 515-519, 1999.

GUIZONI, M. D.; OKOSHI, M. P.; LIMA, A. R.; MARTINEZ, P. F.; DAMATTO, R. L.; OKOSHI, K. Expressão da miostatina e follistatina em músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca crônica. **Faculdade de Medicina/UNESP**. P. 1-10, 2009.

HENIK, R. A. Echocardiography and doppler ultrasound. In: MILLER, M. S.; TILLEY, L. P. Manual of canine and feline cardiology. cabdirect.org 2 ed. Philadelphia : Saunders, p.75-107, 1995.

HIROKI, E.; ABE, S.; IWANUMA, O.; SAKIYAMA, K.; YANAGISAWA N.; SHIOZAKI, K.; IDE, Y. A comparative study of myostatin, follistatin and decorin expression in muscle of different origin. **Anatomical Science International**. v.86, n. 3, p.151-159, 2011.

HNIA, K.; GAYRAUD, J.; HUGON, G.; RAMONATXO, M.; PORTE, S. D. L.; MATECKI, S.; MORNET, D. L-Arginine Decreases Inflammation and Modulates the Nuclear Factor-B/Matrix Metalloproteinase Cascade in Mdx Muscle Fibers. **The American Journal of Pathology**. v. 172, p. 1509-1519, 2008.

JAUDON, J.P., PERROT, C., VIAUD, F. *et al* Bases físicas, tecnológicas e semiológicas da ultra-sonografia clínica. **A Hora Veterinária**, v.11, n.64, p.10-16, 1991.

JORDE, L. B. Genética médica. Rio de Janeiro: **Elsevier**. p.111-113. 2004.

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

KABBINAVAR, F.; HURWITZ, H.I.; FEHRENBACHER, L.; MEROPOL, N.J.; NOVOTNY, W.F.; LIEBERMAN, G.; GRIFFING, S.; BERGSLAND, E.; Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 21, n. 1, p. 60-5, 2003.

KABEYA, H.; UMEHARA, T.; OKANISHI, H.; TASAKI, I.; KAMIYA, M.; MISAWA, A.; MIKAMI, T.; MARUYAMA, S. Experimental infection of cats with *Bartonella henselae* resulted in rapid clearance associated with T helper 1 immune responses. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 716-720, 2009.

KARIN, M. The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NFkappaB activation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n.6362, p.27339–27342, 1999.

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

KARIN, M.; DELHASE, M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. **Seminars in Immunology**. v. 12, n.1, p. 85–98, 2000.

KASAHARA, Y.; TUDER, R.M.; TARASEVICIENE-STEWART, L.; LE CRAS, T.D.; ABMAN, D.; HIRTH, P.K.; WALTENBERGER, J.; VOELKEL, N.F. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 106, n. 11, p. 1311-9, 2000

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. Guanabara Koogan. e.9, p. 492, 787, 788, 887, 889, 2006.

KATZUNG, B. G. Peptídeos vasoativos. REID, I.A. **Farmacologia básica & clínica**. Guanabara Koogan. e.10, p.250-251, 2007.

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.

KHAIRALLAH, M.; KHAIRALLAH, M. E.; YOUNG, M. E.; ALLEN, B.G.; GILLIS, M. A.; DANIALOU, G.; DESCHEPPER, C. F.; PETROF, B. J.; DES ROSIERS, C. Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency. . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**. v. 105, n. 19, p. 7028-7033, 2008.

KHERIF, S.; LAFUMA, C.; DEHAUPAS, M.; LACHKAR, S.; FOURNIER, J. G.; VERDIERE- SAHUQUE, M.; FARDEAU, M.; ALAMEDDINE, H. S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. **Developmental Biology**. v. 205, n. 1, p. 158–170, 1999.

KIENLE, R.D.; THOMAS, W.P. Echocardiography. In: NYLAND, T.G., MATTOON, J.S. (Ed.). Veterinary diagnostic ultrasound. Philadelphia : Saunders, p.198-256, 1995.

KOHARA, H.; KITaura, H.; FUJIMURA, Y.; YOSHIMATSU, M.; MORITA, Y.; EGUCHI, T.; MASUYAMA, R.; YOSHIDA, N. IFN- γ directly inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. **Immunology Letters**. v. 137, n. 1-2, p. 53-61, 2011.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; CUNDIFF, D. D.; PETROSKI, G. F.; SCHUELER, R. O. Tarsal joint contracture in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Laboratory Animal Science**. v. 44, p. 331-333, 1994.

KOVACS, E. J. Fibrogenic cytokines: role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immunology Today**. v. 12, p. 17–23, 1991.

KUMAMOTO, T.; FUJIMOTO, S.; ITO, T.; HORINOCHI, H.; UYAMA, H.; TSUDA, T. Proteasome expression in the skeletal muscles of patients with muscular dystrophy. **Acta Neuropathologica**, v. 100, p. 595-602, 2000.

KUMAR, A.; BORIEK, A. M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. **The FASEB journal**. v. 17, n.13, p.386–396, 2003.

KUMAR, A.; TAKADA, Y.; BORIEK, A. M.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor kappa B: its role in health and disease. **Journal of molecular**. v. 82, n. 7, p. 434–448, 2004.

KURU S, INUKAI A, KATO T, LIANG Y, KIMURA S, SOBUE G. Expression of tumor necrosis factor-alpha in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies. **Acta Neuropathologica**. v. 105, n. 3, p. 217–24, 2003.

LARSSON, M. H. M. A. Manual de Eletrocardiografia de Pequenos Animais; p.14-16; 2005.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R.; WILLOUGHBY, D. A. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. **Nature Medicine**, v. 7, p. 1291 – 1297, 2001.

LEE, S. J.; MCPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**. v. 98, n.16, p.9306-9311, 2001.

LEE, W. S.; SUZUKI, Y.; GRAVES, S.S.; IWATA, M.; VENKATARAMAN, G. M.; MIELCAREK, M.; PETERSON, L. J.; IKEHARA, S.; TOROK-STORB, B.; STORB, R. Canine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells Suppress Allo-Reactive Lymphocyte Proliferation in Vitro but Fail to Enhance Engraftment in Canine Bone Marrow Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. p. 1-11, 2010.

LI, Z F.; SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Elimintion of myostatin does not combat muscular dystrophy in dy mice but increases postnatal lethality. **American Journal of Pathology**. V. 166, n. 2, 2005.

LIU, J. M.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; KORNEGAY, J. N. Effects of prednisone in canine muscular dystrophy. **Muscle Nerve**. v.30, v.6, p.767-73, 2004.

LOMBARD, H. J. Microcirculation in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy: Another Blow to the Vascular Hypothesis? **Journal of Applied Physiology**. v. 110, n. 3, p. 587-588, 2011.

LORENZETTI, RAQUEL. Método de quantificação de nucleotídeos por HPLC-MS/MS e avaliação da atividade de análogos de sildenafil sobre fosfodiesterase. **Campinas, SP**: 2007.

LUNDBERG, I.; BRENGMAN, J. M.; ENGEL, A. G. Analysis of cytokine expression in muscle in inflammatory myopathies. Duchenne dystrophy, and non-weak controls. **Journal of Neuroimmunology**. v. 63, n. 1, p.9–16, 1995.

MACHADO, D. L.; **Avaliação da evolução respiratória em paciente com distrofia musuclar de Duchenne submetido a corticoterapia**. Dissertação Mestrado em Ciências. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARTIN, M. W. S. Small animal echocardiography. In: GODDARD, P.J. (Ed). **Veterinary ultrasonography**. UK: Cab International, p.131-165, 1995.

MATSUMURA, C. Y.; PERTILLE, A.; ALBUQUERQUE, T. C. P.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J. Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficien muscle fibers of mdx mice from degeneration: a potential role in calcium buffering and sarcolemmal stability. **Muscle & Nerve**. V. 39, p. 167-176, 2009.

McPHERRON A. C.; LEE, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**. v. 94, p. 12457-12461, 1997.

MELCHERT, M.; LIST, A. The thalidomide saga. **The international journal of biochemistry & cell biology**. v. 39, p. 1489-1499, 2007.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária – Interpretação e diagnóstico**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1995.

MONICI, M. C.; AGUENNOUZ, M.; MAZZEO, A.; MESSINA, C.; VITA, G. Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**. v. 60, n. 6, p. 993–997, 2003.

MORCERF, F. A. P. Ecocardiografia uni-bidimensional, transesofágica e doppler. 2 ed. Rio de Janeiro : **Revinter**,. p. 671, 1996.

MORINE, K. J.; BISH, L. T.; SELSBY, J. T.; GAZZARA, J. A.; PENDRAK, K; SLEEPER, M. M.; BARTON, E. R.; LEE, S.; SWEENEY, L. Activin IIB receptor blockade attenuates dystrophic pathology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. **Muscle Nerve**. v. 42, p. 722-730, 2010.

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

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal Compendium of Pathology**. v. 126, n. 2-3, p. 100-108, 2002.

NICHOLSON, B. T.; CENTER, S. A.; RANDOLPH, J. F. Effects of oral ursodeoxycholic acid in healthy cats on clinicopathological parameters, serum bile acids and light microscopic and ultrastructural features of the liver. **Research Veterinary Science**. v. 61, p. 258–62, 1996.

NIGRO, D.; FORTES, Z. B. Pharmacological effects of diuretics and calcium channel blockers. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 12; n. 2; p. 103-107, 2005.

PALMIERI, B.; SBLENDORIO, V. Duchenne muscular dystrophy: rational basis, state of the art. **Recenti Progressi in Medicina**. v. 97, n.9, p.441-447, 2006.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. A mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of the neurological Sciences**. v. 129, n. 2, p. 97-105, 1995.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of the neurological Sciences**. v. 129, n. 2, p. 97-105, 1995.

PAUMGARTNER, G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: from pathobiology to pharmacological targets. **World Journal of Gastroenterology**. v. 12, n. 28, p. 4445–4451, 2006.

PATEL, T. V.; MORGAN, J.A.; DEMETRI, G.D.; GEORGE, S.; MAKI, R.G.; QUIGLEY, M.; HUMPHREYS, B.D. A preeclampsia-like syndrome characterized by reversible hypertension and proteinuria induced by the multitargeted kinase inhibitors sunitinib and sorafenib. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 100, n. 4, p. 282-4, 2008.

PERCIVAL, J. M.; WHITEHEAD, N. P.; ADAMS, M. E.; ADAMO, C. M.; BEAVO, J. A.; FROEHNER, S. C. Sildenafil reduces respiratory muscle weakness and fibrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Pathology**, v. 228, p. 77–87, 2012.

PERES, M. A. Influência da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) na viabilidade espermática e nas características morfológicas do aparelho reprodutor masculino. 82f. Tese “Doutorado em Ciências” – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PERKINS, K. J.; DAVIES, K. E. The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**. v. 12, p. 78–89, 2002.

PLATE K.H. From angiogenesis to lymphoangiogenesis. **Nature Medicine**, v.2, n.7, p.151- 152, 2001.

PORRECA, E.; GUGLIELMI, M. D.; UNCINI, A.; DI GREGORIO, P.; ANGELICI, A.; DI FEBBO, C.; PIERDOMENICO, S. D.; BACCANTE, G.; CUCCURULLO, F. Haemostatic abnormalities, cardiac involvement and serum tumor necrosis factor levels in X-linked dystrophic patients. **Thrombosis Haemostasis**. v. 81, n. 4, p. 543–546, 1999.

PORTER, J. D.; MERRIAM, A. P.; LEAHY, P.; GONG, B.; FEUERMAN, J.; CHENG, G.; KHANNA, S. Temporal gene expression profiling of dystrophin-deficient (mdx) mouse diaphragm identifies conserved and muscle group-specific mechanisms in the pathogenesis of muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**. v.13, p. 257–269, 2004.

PORTER, J. D.; KHANNAL, S.; KAMINSKI, H. J.; RAO, J. S.; MERRIAM, A. P.; RICHMONDS, C. R.; LEAHY, P.; LI, J.; GUO, W.; ANDRADE, F. H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. **Human Molecular Genetics**. v. 11, n. 3, p. 263-272, 2002.

RAFAEL, J.A.; TINSLEY, J.M.; POTTER, A.C.; DECONINCK, A.E.; DAVIES, K.E. Skeletal musclespecific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. **Nat Genet**. v. 19; p. 79 – 82, 1998.

RAFIEE, P.; STEIN, D. J.; NELSON, V.M.; OTTERSON, M.F.; SHAKER R.; BINION, D.G. Thalidomide inhibits inflammatory and angiogenic activation of human intestinal microvascular endothelial cells (HIMEC). *American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. v. 298, n., p. 167-176, 2010.

RAJFER, J.; ARONSON, W. J.; BUSH, P. A.; DOREY, F. J.; IGNARRO, L. J. Nitric oxid as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nondrenergic, noncholinergic neurotransmission. *New England Journal Medicine*. v. 326, p. 90-94, 1992.

RAMALHO, R.M.; VIANA, R.J.; LOW, W.C.; STEER, C.J.; RODRIGUES, C.M. Bile acids and apoptosis modulation: an emerging role in experimental Alzheimer's disease. **Trends is Molecular Medicine**. v. 14, n.2, p.54–62, 2008.

RAMIREZ, E.Y.; PALANCA, I. M.; VADILLO, A. C. Tratamento da Insuficiência Cardíaca Congestiva. In: BELERENIAN G. C.; MUCHA, C. J.; CAMACHO, A. A. *Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais*. São Paulo: Interbook, p.78-117, 2003.

RECHE, A.; DANIEL, A. G. T.; STRAUSS, T. C. P. L.; TABORDA, C. P.; MARQUES, S. A. V.; HAIPEK, K.; OLIVEIRA, L. J. MONTEIRO, J. M.; KFOURY, J. R. Cutaneous mycoflora and CD4:CD8 ratio of cats infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 4, p. 355-358, 2010.

RIBEIRO, A. B.; GAVRAS, H. Angiotensin II antagonists- clinical experience in the treatment of hypertension, prevention of cardiovascular outcomes and renal protection in diabetic nephropathy and proteinuria. **Arquivos Brasileira de Endocrinologia e Metabologia**. v. 50, p. 327-333, 2006.

RIDEAU, Y. Treatment of Duchenne's myopathy with early physiotherapy. Critical analysis. **Archives of Frenchy pediatrics**. v. 42, p. 17-21, 1985.

RIVARD, A. L.; STEER, C. J.; KREN, B. T.; RODRIGUES, C. M.; BIANCO, R. W.; LOW, W. C. Administration of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) reduces apoptosis following myocardial infarction in rat. **The American Journal of Chinese Medicine**. v. 35, p. 279-95, 2007.

RUSTIN, P.; VON KLEIST-RETZOW, J. C.; CHANTREL-GROUSSARD, K.; SIDI, D.; MUNNICH, A.; ROTIG, A. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. **Lancet**. v. 354, p. 477-479, 1999.

SAMUELSON, D. A. **Tratado de Histologia Veterinária**. 1ª Ed Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 527p.

SCHWARTZ, M. D.; MOORE, E. E.; MOORE, F. A.; SHENKAR, R.; MOINE, P.; HAENEL, J. B.; ABRAHAM, E. Nuclear factor-kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. **Critical Care Medicine**. v. 24, n. 8, p. 1285-1292, 1996.

SENFTLEBEN, U.; KARIN, M. The IKK/NF-kappa B pathway. **Critical Care Medicine**. v. 30, p. 18-26, 2002.

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

SILVA, M. B. Tese: **O Efeito do Losartan na morfologia do músculo esquelético do modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy: uma droga promissora para a regeneração da musculatura distrófica?**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, 2009.

SPENCER, M. J.; MARINO, M. W.; WINCKLER, W. M. Altered pathological progression of diaphragm and quadriceps muscle in TNF-deficient, dystrophin-deficient mice. **Neuromuscular Disorders**. v. 10, p. 612–19, 2002.

SQUIRE S, RAYMACKERS JM, VANDEBROUCK C, POTTER A, TINSLEY J, FISHER R, et al Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. **Human Molecular Genetic**. v. 11, p. 3333- 3344, 2002.

STEPIEN, R. L. Therapy of common cardiac arrhythmias. *In*: WALTHAM/OSU SYMPOSIUM, 1994, Ohio. *Proceedings...* Ohio: Waltham, 1994. p. 68-77.

STEPHAN, U. Acetylcysteine in the oral mucolytic treatment of cystic Fibrosis. **European Journal Respiratory diseases**. v. 61, suppl 111, 1980.

TANABE, Y.; ESAKI, K.; NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in x chromosomal-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. **Acta Neuropathol**. v. 69, p. 91-95, 1986.

TANIGUTI, A. P. T.; PERTILLE, A.; MATSUMURA, C. Y.; NETO, H. S.; MARQUES, M. J. Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in *mdx* mice by suramin, a $\text{tgf-}\beta$ blocker. **Muscle Nerve**. v. 43, p. 82-87, 2011

TEO, S. K.; EVANS, M. G.; BROCKMAN, M. J.; EHRHART, J.; MORGAN, J. M.; STIRLING, D. I.; THOMAS, S. D. Safety Profile of Thalidomide after 53 Weeks of Oral Administration in Beagle Dogs. **Toxicological sciences**. v. 59, p. 160–168, 2001.

THALOOR, D.; MILLER, K. J.; GEPHART, J.; MITCHELL, P. O.; PAVLATH, G. K. Systemic administration of the NF- κ B inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury. **The American Journal of Physiology**. v. 277, p. 320–329, 1999.

TIAN, M.; JACOBSON, C.; GEE, S. H.; CAMPBELL, K. P.; CARBONETTO, S.; JUCKER, M. Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. **The European Journal of Neuroscience**. v. 8, n. 12, p. 2739-2747, 1996.

TILLEY, L. P. *Essentials of canine and feline electrocardiography: interpretation and treatment*. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 470p.

TINSLEY, J. M.; POTTER, A. C.; FHELPS, S.R.; TRICHETT, J.I.; DAVIES, K. E. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. **Nature**. v. 384, p. 349–353, 1996.

TROLLET, C.; ATHANASOPOULOS, T.; POPPLEWELL, L.; MALERBA, A.; DICKSON, D. Gene therapy for muscular dystrophy: current progress and future prospects. **Expert Opinion on Biological Therapy**. v. 9, n. 7, p. 849-866, 2009.

TURKO, I. V.; FRANCIS, S. H.; CORBIN, J.D. Potencial roles of conserved amino acids in the catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Journal Biology Chemistry*. V. 273, p. 6460-6466, 1998.

VALENTINE, B. A.; BLUE, J. T.; COOPER, B. J. The effect of exercise on canine dystrophic muscle. **American Neurological Association**, v. 26, n. 4, p. 588, 1989.

VALENTINE, B. A.; BLUE, J. T.; SHELLEY, S. M.; COOPER, B. J. Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, p. 140-143, 1990.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B.J.; LAHUNTA, A.; BLUE, J.T. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal neurology Science**, v. 88, p. 69-81, 1988.

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 DEUTEKOM, J. C. T.; JANSON, A. A.; GINJAAR, I. B.; FRANKHUIZEN, W. S.; AARTSMA-RUS, A.; BREMMER-BOUT, M. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PR0051. **New England Journal Medicine**. v. 357, p. 2677–2686, 2007.

VARO, N.; IRABURU, M. J.; VARELA, M.; LOPEZ, B.; ETAVO, J. C.; DIEZ, J. Chronic AT1 blockade stimulates extracellular collagen type 1 degradation and

reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 35, p. 1197-1202, 2007.

VETRONE, S. A.; RODRIGUEZ, E. M.; KUDRYASHOVA, E.; KRAMEROVA, I.; HOFFMAN, E. P.; LIU, S. D.; MICELI, M. C.; SPENCER, M. J. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF- β . *The Journal of Clinical Investigation*. v. 119, p.1583-1594, 2009.

VINCENTI, V.; CASSANO, C.; ROCCHI, A.; PERSICO, G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. **Circulation**, v. 93, n. 8, p. 1493-5, 1996.

WAGNER, K. R.; HAMED, S.; HADLEY, D. W.; GROPMAN, A. L.; BURSTEIN, A. H.; ESCOLAR, D. M. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. **Annuary Neurology**, v. 49, p.706–711, 2001.

WAGNER, K. R.; MCPHERRON, A. C.; WIKINIK, N.; LEE, S. J. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. **Annuary Neurology**, v. 52, p. 832-836, 2002.

WATANABE, N. Clinical significance of measurement of circulating tumor necrosis factor alpha. **Rinsho Byori**, v. 49, n. 9, p. 829–833, 2001.

WATSON, C. J. et al Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. **Cytokine**, Philadelphia, v. 12, n. 8, p. 1232-5, 2000.

WEBB, C. B.; LEHMAN, T. L.; MCCORD, K. W. Effects of an oral superoxide dismutase enzyme supplementation on indices of oxidative stress, proviral load, and CD4:CD8 ratios in asymptomatic FIV-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 423-230, 2008a.

WEBB, C.; LEHMAN, T.; MCCORD, K.; AVERY, P.; DOW, S. Oxidative stress during acute FIV infection in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 122, p. 16-24, 2008b.

WEBSTER, C. R. L; COOPER, J. Therapeutic use of cytoprotective agents in canine and feline hepatobiliary disease. **Veterinary Clinical Small Animal**. v. 39, p. 631-652, 2009.

WEIR, A. P.; BURTON, E. A.; HARROD, G.; DAVIES, K. E. A- and B utrophin have different expression patterns and are differentially up-regulated in *mdx* muscle. **Journal Biology Chemistry**. v. 22, n. 277, p. 45285-90, 2002.

WILLIAMS, S.R.; ANNEX, B.H. Plasticity of myocytes and capillaries: a possible coordinating role for VEGF. *Circulation Research*. v.94, p. 7-8, 2004.

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

YAMAZAKI, M.; MINOTA, S.; SAKURAI, H.; MIYAZONO, K.; YAMADA, A.; KANAZAWA, I.; KAWAI, M. Expression of transforming growth factor-beta1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. **American Journal Pathology**. v.144, n. 221– 226, 1994.

YIU, E. M.; KORNBERG, A. J. Duchenne muscular dystrophy. **Neurology India**. v. 56, n. 3, p. 236-247, 2008.

ZAFARULLAH, M.; LI, W. Q.; SYLVESTER J. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cell Molecular Life Science**. v. 60 p. 6–20, 2003.

ZHANG, C.; MCFARLENE, C.; LOKIREDDY, S.; BONALA, S.; GE, X.; MASUDA, S.; GLUCKMAN, P. D.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the AMP-activated protein kinase signalling pathway. **Diabetologia**, v. 54, n. 6, p. 1491-1501, 2011.