MARINA BRITO SILVA

O Efeito do Losartan na morfologia do músculo esquelético do modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy: uma droga promissora para a regeneração da musculatura distrófica?

São Paulo

2009

MARINA BRITO SILVA

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 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 Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2143
FMVZ

Silva, Marina Brito

O Efeito do Losartan na morfologia do músculo esquelético do modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy: uma droga promissora para a regeneração da musculatura distrófica? / Marina Brito Silva. – São Paulo : M. B. Silva, 2009.
88 f. : il.

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

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. Losartan. 2. Golden Retriever (GRMD). 3. TGF-beta. 4. Distrofia muscular. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Losartan na morfologia do músculo esquelético do modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy: uma droga promissora para a regeneração da musculatura distrófica?", protocolado sob o nº1175/2007, utilizando 04 (quatro) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

(We certify that the Research "Losartan in the skeletal muscle morphology of Golden Retriever Muscular Dystrophy model: a promising drug for the dystrophic muscle regeneration?", protocol number 1175/2007, utilizing 04 (four) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/07.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Marina Brito

Título: 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 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura _____
Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa a todos os pacientes com Distrofia Muscular, principalmente àqueles que tive a alegria de conviver. Vocês foram o meu maior incentivo e serão sempre um exemplo de vida!

Aos queridos cães do canil GRMD-Brasil que serviram não apenas como modelo animal de pesquisa, mas como uma força para enfrentar cada obstáculo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por colocar no meu caminho as pessoas e vivências necessárias para fazê-la valer a pena!

Aos professores Maria Angélica Miglino e Carlos Eduardo Ambrósio, pela oportunidade e confiança na realização do tão desejado mestrado.

A prima Maria Helena, sempre disposta a ajudar o próximo, me abriu essa oportunidade única.

Ao meu futuro marido e eterno companheiro, Rodrigo, pelo amor, apoio e paciência dedicados em todos os momentos.

Aos meus pais, Joaquim e Dora, os grandes incentivadores do meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus queridos irmãos, Cláudia, Elisa e Saulo, pela alegria do convívio em família.

A todo o grupo do canil, pelos momentos de união e apoio. Pessoas que se tornaram muito importantes não apenas para a realização dessa pesquisa, mas como grandes amigos: Thais: que desde o início foi sempre tão solícita, suas idéias e sugestões foram fundamentais para esse estudo. Levo comigo sua determinação e otimismo! Angélica: difícil até achar palavras para dizer o quanto você é especial para mim, obrigada pela amizade! Leandro: deixo aqui meu eterno agradecimento pelas muitas horas de discussão e de amizade, não consigo imaginar essa pesquisa sem seus ensinamentos e sugestões. Karlinha: sempre com uma palavra de apoio e força, você é só sucesso! Marininha: exemplo de determinação, obrigada pela ajuda! Os amigos Jú Passos, Matheus, Sarmento, Cris, Renata, Carol, Di, agradeço pelos momentos de alegria e contribuição dentro e fora do canil!

Ao querido funcionário do canil e amigo Augusto, pela sua caridade incondicional.

A profa. Dr. Mayana Zatz, pela busca incessante ao tratamento da distrofia muscular.

A professora Maria Helena Larsson, por disponibilizar sua atenção e serviços de laboratório e cardiologia.

Aos queridos funcionários, Jaque, Maicon, Diogo e Ronaldo pela atenção e ajuda necessária.

A professora Patrícia Gama e todo seu grupo de pesquisa, por me acolherem tão bem em seu laboratório e me guiarem nas reações de imuno-histoquímica.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

SILVA, M. B. **O efeito do Losartan na morfologia do músculo esquelético do modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy: uma droga promissora para a regeneração da musculatura distrófica?** [The effect of Losartan in the skeletal muscle morphology of Golden Retriever Muscular Dystrophy: a promising drug for the dystrophic muscle regeneration?]. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) tem como característica marcante a substituição do músculo pelo tecido fibroso, sendo este um dos maiores obstáculos para a eficácia de terapias para a distrofia muscular. Intervenções para preveni-la provavelmente poderão ser necessárias como parte de um tratamento eficaz. Correlações significativas entre fibrose e a expressão do TGF-beta, uma citocina fibrogênica multifuncional nas distrofias musculares têm sido relatadas, enfatizando o papel dessa citocina no desenvolvimento da fibrose muscular e sugerindo-a como alvo para terapias antifibróticas. Nesse estudo avaliamos o efeito do Losartan sobre o desenvolvimento da fibrose na musculatura esquelética do modelo canino Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD). Foi realizado previamente um estudo piloto com um cão distrófico para estipular dosagem e eventuais efeitos colaterais ao medicamento. Foram utilizados cinco cães adultos, sendo dois machos e duas fêmeas e um animal controle. Utilizou-se a dose de 50mg de Losartan, administrada via oral, uma vez ao dia. Os exames clínicos e laboratoriais não evidenciaram reação adversa durante o período do experimento, portanto, o Losartan mostrou-se como uma terapia segura. Os fragmentos da biopsia muscular retirados antes de iniciar com o Losartan (T0) e após (Tf) foram utilizados para histologia e imuno-histoquímica do TGF-beta1 para comparação destes dois tempos. As avaliações de goniometria e perimetria juntamente com os resultados de imuno-histoquímica e quantificação do colágeno ajudaram a inferir sobre o efeito do Losartan na fibrose do músculo distrófico. Não foi encontrada diferença significativa para os valores de goniometria e perimetria. Já a porcentagem da área de deposição de colágeno dos animais nos Tf foi

estatisticamente menor do que o T0. A diminuição da presença do TGF-beta1 evidenciada nas imagens de imuno-histoquímica, com a diminuição do depósito de colágeno, após o período de uso do Losartan, sugerem um efeito inibitório do medicamento sobre esta citocina nos músculos dos cães GRMD estudados.

Palavras-chave: Losartan. Golden Retriever (GRMD). TGF-beta. Distrofia Muscular.

ABSTRACT

SILVA, M. B. **The effect of Losartan in the skeletal muscle morphology of Golden Retriever Muscular Dystrophy: a promising drug for the dystrophic muscle regeneration?** [O efeito do Losartan na morfologia do músculo esquelético do modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy: uma droga promissora para a regeneração da musculatura distrófica?]. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) has the substitution of the muscle by connective tissue as its most relevant characteristic. Once fibrotic proliferation is a major obstacle to the efficacy of therapies for muscular dystrophies, early interventions to prevent it will probably be necessary as part of an effective treatment. A significant correlation between fibrosis and the expression of TGF-beta 1, a multifunctional cytokine, in Duchenne muscular dystrophies has been reported, emphasizing the role of this cytokine in the development of muscle fibrosis, and suggesting it as target for fibrotic therapies. In this study we evaluated the effect of Losartan over the development of the connective tissue on the skeletal musculature of the canine model GRMD. One dystrophic dog was previously used in the pilot study to estipulate the dosage and any side effects caused by Losartan. Five adults dystrophics dogs, two male and two female and one control animal were used in the experiment. A dose of 50mg of Losartan was orally given once a day. The clinical and laboratorial exams did not show any adverse effect through the experimental period, therefore Losartan utilization showed to be a safe therapy. Muscle biopsy fragments have been removed before starting Losartan (T0) and after (Tf) were used for histology and TGF-beta1 imunohistochemistry to compare this two times. The evaluations range of motion and limb circumference measures within imunohistochemistry and collagen quantification results helped to infer about Losartan effect in the dystrophic muscle fibrose. Range of motion and limb circumference values did not show statistical difference. Although the percentage of connective tissue deposition area in the animals in Tf was statistically lower than T0. The decrease of TGF-beta1 signalization showed in

immunohistochemistry pictures within the decrease of connective tissue deposition, after Losartan, suggest an inhibitory effect of this medication through this cytokine in the studied GRMD muscle.

Key Words: Losartan. Golden Retriever (GRMD). TGF-beta. Muscle Dystrophy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	13
2.2 Modelo de estudo	15
2.3 Regeneração Muscular/ Reparação tecidual	17
2.4 Losartan	19
2.5 TGF- beta.....	22
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Delineamento experimental	28
4.2 Estudo Piloto.....	29
4.3 Protocolo de uso do Losartan	32
4.4 Parâmetros de Avaliação	32
4.4.1 Avaliação da amplitude de movimento articular ou Goniometria	33
4.4.2 Avaliação da Circunferência do membro ou Perimetria.....	33
4.4.3 Biópsia muscular	34
4.4.4 Protocolo Histológico – Morfometria	35
4.4.5 Protocolos de Imuno-histoquímica (IHC).....	36
4.4.5.1 Protocolo Imuno-histoquímica (IHC) para o TGF-beta 1	36
4.4.5.2 Protocolo Imuno-histoquímica (IHC) para a Distrofina	37
4.4.6 Pressão Arterial (P.A.).....	38
4.5 Exames laboratoriais	38
4.5.1 Exame de Urina	39
4.5.2 Hemograma, bioquímicas sérica e urinária	39
4.6 Análise Estatística.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Piloto	42
5.1.1 Exame de urina	47
5.2 Experimento.....	50
5.2.1 Exame clínico	50
5.2.2 Exames de sangue.....	51
5.2.3 Morfologia da fibra muscular.....	55
5.2.4 Quantificação do Colágeno.....	56
5.2.5 Imuno-histoquímica (IHC)	59
5.2.6 Avaliação da Amplitude de movimento articular ou Goniometria.....	65
5.2.7 Circunferência do membro ou Perimetria.....	67
6 DISCUSSÃO.....	71
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) constitui um distúrbio genético, de caráter recessivo, com alta taxa de mutação em um gene localizado no braço curto do cromossomo X. 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 desenvolve 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. Ela caracteriza-se pela deficiência ou ausência de proteína distrofina na superfície da membrana da célula muscular, podendo acometer a musculatura cardíaca e o sistema nervoso (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 (COULTON, 1988; PASTORET, 1995; TANABE, 1996).

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).

Embora o camundongo *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 Golden Retriever Muscular Dystrophy (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).

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, melhoram a qualidade de vida dos mesmos (COHN, 2007).

Quanto ao tratamento de manutenção, principalmente de fisioterapia, a literatura científica, ainda que escassa, recomenda diferentes programas de exercício 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).

Dentre os agentes terapêuticos propostos para uso no paciente DMD, o Losartan, um bloqueador do receptor da angiotensina II, pode ser bastante promissor, já com resultados positivos no modelo *mdx*, uma vez que equilibrou os ciclos de degeneração e reparação (COHN et al., 2007).

Sendo estes ciclos os principais responsáveis pela perda progressiva de massa e força musculares em portadores de DMD, novas pesquisas em um modelo animal com maior similaridade clínica da doença, o GRMD, tornam-se necessárias, com o objetivo de gerar novos conhecimentos sobre seu efeito na progressão desta doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

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 mifibrilas (BERGMAN et al., 2002). A DMD é a forma mais grave, comum e de evolução mais rápida dentre 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).

Mutações no gene da distrofia levam à deficiência da distrofina, uma proteína 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).

Segundo Valentine et al. (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 protéico estar embebido 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).

Esta descoberta importante feita há mais de dez anos abriu novos caminhos para investigações produtivas. O complexo processo relacionado à necrose da fibra muscular não tem sido claramente descrito, portanto não existe ainda nenhum marco de melhora no tratamento dos pacientes (TKATCHENKO et al., 2001).

Vainzof e Zatz (2003) relataram que estudos moleculares em indivíduos com distrofias musculares, têm apresentado variabilidade clínica inter e intra-familiar em

diferentes desordens genéticas, levantando a importância de outros fatores, que não os genéticos, na determinação da expressão fenotípica.

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 quando no modelo canino GRMD, resultam em fibroses, contraturas e fraqueza muscular (CHILDERS et al; 2002).

O diagnóstico de DMD pode ser estabelecido na maioria dos casos, através da história familiar, de achados clínicos, laboratoriais e genéticos (análise de DNA), podendo ser utilizados eventualmente, exames eletrofisiológicos e histológicos. 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 pode-se diagnosticar a DMD ao detectar menos de 3% de distrofina no músculo, associada à diminuição de α -sarcoglicanas (ERAZO-TORRICELLI, 2004).

Na análise da estrutura do músculo esquelético a partir da biópsia, realizada normalmente nos músculos quadríceps, gastrocnêmio ou deltóide, observa-se padrão distrófico, ou seja, comum às distrofias musculares progressivas, mostrando hipertrofia e atrofia de fibras, perda da forma poligonal em corte transversal, necrose e regeneração de fibras com deposição de tecido conjuntivo e adiposo. Em algumas distrofias, tais como as congênitas (DMC) e fascioescapulohumeral (DFEH), o padrão distrófico da fibra muscular não se apresenta em idades precoces. Desta forma, a ausência de alterações distróficas características, nem sempre descarta a existência de uma distrofia muscular (CAROMANO, 1999; ERAZO-TORRICELLI, 2004).

Wang et al. (1999) investigaram trinta pacientes portadores de DMD e notaram que alterações histopatológicas foram observadas em todos os casos estudados, tais como degeneração, necrose e regeneração de fibras musculares. Em relação às reações imuno-histoquímicas, todos os sujeitos mostraram reação

negativa para anticorpos anti-distrofina Dys1-3. Em três dos trinta casos estudados, com quadro clínico severo, foram observadas algumas características diferentes na morfometria, como ausência de diferença no diâmetro das fibras do tipo I e II, e o diâmetro das fibras do tipo I em um dos casos foi menor do que todos os outros trinta, com grande proliferação de tecido conjuntivo e adiposo.

O estudo imuno-histoquímico permite detectar a presença ou ausência de proteínas do sarcolema ou ligadas a esta membrana, incluindo a determinação da porcentagem de núcleos centralizados e a variabilidade do tamanho das fibras. Ambos os parâmetros juntos descrevem bem o processo de degeneração-regeneração da musculatura esquelética (BRIGUET, 2004; ERAZO-TORRICELLI, 2004).

2.2 Modelo de estudo

Modelos animais são usados para fornecer hipóteses científicas na DMD. Dentre eles, os mais estudados são o camundongo *mdx* e o canino Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD).

O camundongo *mdx* mantém relativamente seu quadro clínico devido à patologia ser considerada moderada e a função mecânica muscular pouco comprometida, além de não apresentar fibrose endomisial extensiva, uma das características patológicas mais importantes na DMD (YAMAZAKI et al., 1994; COLLINS & MORGAN, 2003). Por outro lado, o modelo canino GRMD além de apresentar o curso rapidamente progressivo e fatal da doença, possui o envolvimento muscular análogo aos pacientes com DMD. Portanto, os testes de força muscular e de amplitude de movimento podem ser usados como parâmetros em cachorros afetados, predizendo dessa forma os resultados do tratamento e a patogênese (CHILDERS et al., 2002).

O GRMD é considerado o modelo animal mais relevante para o estudo da DMD, embora o uso deste modelo animal para pesquisa requer um alto custo, além de possuir uma variação intra-animal a qual dificulta uma padronização (COLLINS; MORGAN, 2003; MCCLOREY et al., 2006).

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 e o Beagle. 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-se 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 atrófica, 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 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).

Estudos “in vivo” da musculatura pélvica têm mostrado que cachorros com distrofia muscular de Duchenne são mais fracos que os cachorros normais em todas as idades. Essas semelhanças clínicas na evolução e gravidade da distrofia entre humanos com DMD e o modelo GRMD, justificam seu uso como modelo de estudo para os mecanismos que contribuem para a lesão em músculos distróficos (CHILDERS, 2001).

2.3 Regeneração Muscular/ Reparação tecidual

A distrofia muscular progressiva (DMP) é caracterizada pela necrose das fibras musculares, regeneração e fibrose endomisial (YAMAZAKI et al., 1994).

Durante a lesão muscular o músculo esquelético tem a extraordinária habilidade de iniciar um processo de reparação rápido e extensivo, prevenindo a perda de massa muscular. A reparação do músculo esquelético é um processo rapidamente sincronizado envolvendo a ativação de várias respostas celulares. A fase inicial da reparação muscular é caracterizada pela necrose do tecido lesado e ativação da resposta inflamatória. Esta fase é rapidamente seguida da ativação das células miogênicas para proliferar, diferenciar e se fundirem, ocorrendo a formação de uma nova miofibrila e reconstituição do aparato contrátil funcional (CHARGÉ, 2004).

As células satélites são células miogênicas que participam na reparação e crescimento das fibras musculares (REIMANN et al., 2000). A ativação da célula satélite adulta é o elemento chave neste processo. O fator de sinalização liberado durante o processo de regeneração tem sido identificado, mas suas funções ainda não foram totalmente definidas. Evidências recentes suportam a idéia de uma possível contribuição das células troncos adultas no processo de regeneração muscular (CHARGÉ, 2004).

É sabido que a falta de distrofina na DMD resulta em necrose da fibra muscular logo no início da doença e que a capacidade de regeneração fica comprometida ao longo do curso da doença. Sabe-se também que o fator de crescimento (TGF-beta) tem propriedades que podem causar inibição parcial temporária de diferenciação das células satélites inibida. A remoção da sinalização do TGF durante estágios tardios de regeneração podem resultar na fusão extensiva das células satélites e subsequente formação de novas fibras (ALLEN; BOXHORN, 1987).

Estudo feito por Cozzi et al. (2001), mostrou que a substituição do músculo por tecido fibrótico foi claramente evidenciada bem antes de completar a maturação muscular, mostrando que esta não é um fator crítico para a iniciação da necrose da fibra no modelo canino, ao contrário do que é sugerido para a DMD.

Ainda nesse estudo, as porcentagens de fibras necrosadas e hipercontraturadas mostraram declínio para níveis moderados e estáveis em animais distróficos idosos. A regeneração, a qual mostrou-se prevalente durante o estágio inicial da lesão, também declinou para níveis baixos em animais adultos. Este declínio pode ser devido à exaustão do potencial de regeneração seguido de repetidos ciclos de degeneração-regeneração (COZZI et al., 2001).

O aumento progressivo da fibrose intersticial no músculo acaba impedindo a migração das células miogênicas, as quais são necessárias para a formação muscular (LUZ et al., 2002). A proliferação do tecido conectivo é também variável nos pacientes com DMD, e embora a fibrose geralmente aumente com a progressão da doença, ela pode não estar relacionada com a idade (COZZI et al., 2001).

O papel da fibrose não tem sido bem esclarecido e ainda não é claro porque a capacidade de regeneração declina na DMD e em camundongos mdx (LUZ et al., 2002).

A fibrose é capaz de limitar a utilidade de terapias gênicas ou transplantação mioblastica para corrigir o defeito primário, já que a proliferação de tecido conectivo barra o suporte nutricional para a fibra muscular e a migração e fusão de novas células implantadas. O tratamento anti-fibrose de pacientes DMD, tendo como alvo os mediadores da citocina como o tratamento com antiinflamatórios ou TGF-beta,

podem limitar a degeneração muscular e contribuir para a melhora do curso da doença (PASSERINI et al; 2002).

2.4 Losartan

Losartan 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.

Os antagonistas da angiotensina II (AAls) foram introduzidos para o tratamento da hipertensão arterial há cerca de 10 anos. Durante esse período eles foram avaliados não apenas em termos de eficácia e segurança, mas também em vários estudos grandes com desfechos clínicos (RIBEIRO; GAVRAS, 2006). Os AAls são eficazes em todas as formas clínicas de hipertensão e em todos os grupos étnicos. Foi visto que ele atua efetivamente abaixando a pressão sanguínea em diversos modelos animais e humanos com hipertensão (CHRIST et al., 1993).

Os principais estudos clínicos do Losartan, em pacientes diabéticos com nefropatia e proteinúria comprovaram, além de redução da pressão arterial, proteção cardiovascular e renal (RIBEIRO; GRAVAS, 2006). Segundo Goa et al. (1996), o efeito anti-hipertensivo do Losartan é evidenciado com uma semana de início de uso.

Em paciente com hipertensão moderada, foi relatado que uma dose de 50 a 100 mg do Losartan uma vez ao dia como monoterapia é suficiente para abaixar a pressão em uma semana, ou no máximo seis semanas, além de ser uma droga bem tolerada. O tempo para atingir o pico de concentração no plasma é mais ou menos de uma hora para o Losartan e de três a quatro horas para seu metabólico E 3174. Essa droga pode ser administrada com ou sem comida e em pacientes com alto risco de hipotensão e com disfunção hepática, a dose inicial deve ser de 25mg. Não há necessidade de ajustar a dose para pacientes idosos ou com disfunção renal.

Dados obtidos em poucos pacientes e, evidências em diversos estudos em animais sugerem que o Losartan causa regressão da hipertrofia no ventrículo esquerdo (GOA; WAGSTAFF, 1996).

Estudos recentes também mostraram em camundongos *mdx* que o Losartan normaliza a síntese de colágeno e assim reverte a fibrose ventricular esquerda em ratos com hipertensão espontânea (SHR) (VARO et al., 2007). Estes achados sugerem que o tratamento com Losartan restaura a atividade da collagenase no ventrículo esquerdo de SHR. Portanto, o efeito antifibrótico desse medicamento em SHR parece ser não apenas por sua habilidade em diminuir a síntese de colágeno tipo I, mas também devido sua capacidade de estimular a degradação do colágeno.

Ainda nesse estudo, Varo et al. (2007) relataram que a administração do Losartan resultou na diminuição da expressão do TGF-beta, um fator de crescimento que está presente e aumentado no ventrículo esquerdo dos SHR.

Em um estudo feito em camundongos com hipertensão espontânea foi administrado Losartan via oral em doses de 1 a 30 mg/kg/dia por oito a vinte semanas, e foi evidenciado um aumento da taxa de sobrevivência e a prevenção no desenvolvimento de infartos cerebrovascular e cardiovascular. O efeito foi evidente durante o uso do Losartan e persistiu por oito semanas depois de parado com o medicamento. Foi mostrado também que o Losartan (10mg/kg/dia) reduziu o colágeno e, portanto a fibrose do miocárdio tanto em modelo hipertensivo com um clamp quanto com dois clampes renais (GOA; WAGSTAFF, 1996).

A farmacocinética e a relação de efeito concentração – plasma do Losartan foi determinada em uma pesquisa feita com cachorros anestesiados e conscientes. A biodisponibilidade via oral de doses únicas de 5 a 20 mg/kg mostrou-se consistente e previsível, porém a absorção foi baixa e rápida, com pico de nível no plasma observados em 1 hora. O tempo de eliminação (meia vida) foi de 108 a 153 min. O estudo mostrou alta significância entre a relação concentração e efeito (CHRIST et al., 1993).

Outro estudo foi realizado avaliando o efeito do E-3174, seu metabólico ativo, no sistema cardiovascular no modelo canino. Concluiu-se que este modelo de estudo é apropriado para uso na caracterização dos efeitos do Losartan e seu metabólico nos caninos com insuficiência cardíaca, não havendo diferença entre

eles. Para essa pesquisa foi utilizada uma dosagem de 1 mg/ml/kg do Losartan e 0.3 e 1mg/ml/kg do E-3174 em caninos, administrados pela veia femoral por 10 min de infusão (SUZUKI et al., 2001).

Segundo Christ et al. (1993), o protótipo do antagonista do receptor de angiotensina II, deveria permitir mais o uso racional desta droga em estudos utilizando modelos animais apropriados.

Segundo Sweet et al. (1993), os modelos animais são bons preditores da resposta humana. Embora a formação do maior metabólito do Losartan, o E 3174, diferir de acordo com as espécies, estudos em ambos animais e humanos, sugerem uma associação entre nível de droga no plasma e os antagonistas da angiotensina II.

Goldberg et al. (1995) testaram a segurança e tolerância do Losartan em aproximadamente 2900 pacientes hipertensos tratados em experimentos duplo cego. Os efeitos adversos mais reportados foram dor de cabeça (14.1%), infecções das vias áreas superiores (6.5%), tonturas (14.1%), astenia/fadiga (3.8%) e tosse (3.1%), sendo que estes sintomas também foram freqüentemente reportados em pacientes recebendo placebo. Apenas o sintoma tontura mostrou relação freqüente com os efeitos adversos ao medicamento comparado ao placebo. Em pesquisas clínicas controladas, o Losartan foi a droga mais bem tolerada quando comparada aos outros agentes antihipertensivos, como foi determinado pela incidência de pacientes reportando qualquer experiência relacionada com os efeitos adversos da droga. Não houve nesse estudo nenhuma diferença clínica importante tanto nas fichas clínicas, quanto laboratoriais nos subgrupos demográficos de idade, sexo ou raça, demonstrando uma excelente tolerância.

Até agora, uma das únicas drogas utilizadas rotineiramente em pacientes com DMD é a administração crônica de corticoesterioides (Predinisona). A maioria dos médicos inicia a prescrição diária da Predinisona quando os pacientes começam a apresentar progressivamente os sintomas (CHEN et al., 2005).

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-beta). Estes achados, mais uma vez,

confirmam que a regeneração muscular pode ser relacionada com a inibição da atividade do TGF-beta, cuja proposta está sendo elaborada com o uso do Losartan (WAGNER et.al. 2002).

2.5 TGF- beta

Pelo fato da distrofina estar ausente na membrana sarcoplasmática, tanto nos pacientes quanto no modelo GRMD, durante a contração muscular principalmente, ocorre ruptura dessa membrana, causando o influxo de cálcio e posterior ativação da protease endógena com a ativação da cascata inflamatória (COLLINS; MORGAN, 2003). Como consequência dessa inflamação, ocorre necrose e substituição do tecido muscular por tecido fibroso e adiposo (KORNEGAY et al., 2003).

Embora a falta da distrofina tenha sido conhecida como a causa da degeneração da fibra muscular, a patogênese da fibrose intersticial permanece ainda desconhecida. Porém, sabe-se que envolve a ação de diversas citocinas, como as de transformação do fator de crescimento (TGF- β 1) (GOSSELIN et al., 2004).

TGF- β 1 pertence à família multifuncional de peptídeos que promovem o acúmulo da matriz extracelular, agindo diretamente para estimular a síntese de diversas matrizes moleculares importantes como a fibronectina, colágenos e as proteoglicanas. (KHALIL et al., 2000). Apresenta múltiplas funções, como, por exemplo, pode estimular ou inibir o crescimento de células em cultura, sendo que a proliferação de fibroblastos é aumentada, enquanto que o crescimento das células epiteliais, endoteliais, linfóides e os mioblastos são suprimidos (YONG Li et al; 2003).

O TGF-beta, conhecido por acelerar o crescimento dos fibroblastos devido suas propriedades fibrogênicas, é visto como o primeiro fator responsável pela indução da fibrose em diversos tecidos lesionados, sendo um candidato que pode causar fibrose na DMD e ter um impacto negativo no processo de regeneração muscular, enquanto que em células musculares normais, ele está ausente (YAMAZAKI,1994; YONG LI et al; 2003).

Esse fator de crescimento é pouco descrito no músculo de pacientes, com poucos e recentes estudos sugerindo que a ativação desta via pode levar a apoptose muscular na miopatia. Porém, o TGF-beta 1 é bem conhecido e estudado como regulador de diversas respostas celulares como a proliferação, diferenciação, migração e apoptose, e também é conhecido como um forte modulador da inflamação. O RNAm e a proteína do TGF-beta1 estão aumentado em músculos de pacientes sintomáticos com DMD e outras miopatias (CHEN et al., 2005).

Recente artigo publicado mostrou que o aumento da atividade do TGF-beta no músculo esquelético impede a resposta fisiológica das células satélites de regenerar os músculos nas várias formas de miopatia, um processo essencial para a preservação da arquitetura do músculo e sua função (COHN et al., 2007). Este fator de crescimento induz também o acúmulo de matriz extracelular em várias doenças como as cirroses hepáticas e pneumonite intersticial.

Para investigar sua função na patogênese na Distrofia Muscular Progressiva (DMP) um estudo feito por Yamazaki (1994) determinou o grau de expressão do TGF-beta1 e seu local de imunoreatividade. Foi verificado que TGF-beta 1 apresenta um papel importante na síntese e no acúmulo de matriz extracelular em DMP e está também envolvido na fibrose da DMD (YAMAZAKI, 1994).

Yamazi et al. (1994) reportou que no músculo do paciente com DMD, ocorre alta imunoreatividade do TGF-beta1 na fibra muscular e no espaço extracelular, apesar disso, estes dados pouco indicam o tipo celular do RNA mensageiro (RNAm) do TGF-beta1. Usando hibridização *in situ*, os dados do estudo de Gosselin et al. (2004) indicam que no diafragma do modelo *mdx*, células mononucleadas, presumamente células inflamatórias de infiltração parecem ser a fonte primaria do RNAm do TGF-beta1. Numerosos estudos têm mostrado que o nível de células inflamatórias está significativamente aumentado no músculo do *mdx*, incluindo macrófagos, células T CD4 e CD8, eosinófilos. Destas células, macrófagos parecem contar com o maior número no músculo do *mdx*.

Em marcação de imuno-histoquímica o TGF-beta geralmente está presente em áreas do perimísio e endomísio do tecido conectivo, enquanto em indivíduos normais não apresenta nenhuma marcação (BERNASCONI et al., 1995). Segundo Andreetta et al. (2006) e Ishitobi et al. (2000), o TGF-beta está aumentado no músculo e no plasma de pacientes com DMD.

Estudo feito por Chen et al. em 2005 mostrou que a via do TGF-beta está altamente sinalizada em pacientes sintomáticos com DMD (idade entre 5 -12 anos) mas não na idade infantil, apesar de mostrar uma forte evidencia da resposta inflamatória nesse estágio de vida. Outro estudo relata um pico no nível de TGF-beta1 entre 2- 6 anos de idade (BERNASCONI et al., 1995). Segundo esse mesmo autor, a expressão dessa citocina está relacionada com a idade do paciente e com o grau de fibrose muscular.

Em estudos dos músculos do diafragma em camundongos *mdx*, sinais de fibrose estão presentes desde as seis semanas de idade e o aumento da concentração de colágeno corresponde com o aumento do TGF-beta. Portanto, esta citocina parece ter dois papéis na patogênese do músculo distrófico. Primeiro, promovendo a fibrose muscular, e segundo, inibindo a diferenciação miogênica, no qual poderia contribuir para a perda progressiva das fibras musculares (GOLDSPINK et al., 1977). Juntamente com outros autores, este estudo mostrou que defeitos na degradação do colágeno também têm papel na fibrose do músculo distrófico.

Foi observado em um estudo (YONG LI et al; 2003), que o aumento da expressão do TGF-beta1, estimulou a diferenciação dos mioblastos em células fibróticas in vivo, porém o tratamento com decorin, um inibidor de TGF-beta 1, como visto em outros estudos em camundongos *mdx* (WAGNER, 2002; YONG LI et al., 2003; GOSSELIN, 2004; COHN et al., 2007) preveniu este processo de diferenciação. Estes resultados podem determinar o mecanismo envolvido no desenvolvimento da fibrose na musculatura esquelética lesionada, e conseqüentemente direcionar para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, prevenindo este processo fibrótico e promovendo a regeneração muscular.

Portanto, intervenções terapêuticas que visam neutralizar as citocinas podem ser benéficas na diminuição da progressão patológica da doença (GOSSELIN; WILLIAM, 2004).

Apesar de ser uma estratégia promissora para o aumento da massa e força muscular em pacientes com doenças musculares degenerativas, incluindo a DMD, essa terapia não irá corrigir o defeito molecular nestas patologias. O grande impasse é se o aumento da massa muscular resultante da inibição da atividade da

miostatina (membro da família do TGF-beta) pode ser mantido ao longo do tempo nas etapas repetidas dos ciclos de degeneração e reparação (WAGNER et al; 2002).

3 OBJETIVOS

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

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da droga Losartan no músculo esquelético distrófico no modelo GRMD e sua relação com as alterações músculo-esqueléticas e efeitos adversos do medicamento neste modelo de estudo da DMD.

3.2 Objetivos específicos

- Observar possíveis efeitos adversos em fígado e rins, por meio de avaliação bioquímica do sangue e da função renal, avaliando a viabilidade do uso do Losartan nos cães afetados pela distrofia muscular.
- Identificar, por meio da imuno-histoquímica, a presença de TGF-beta 1 no músculo esquelético de cada animal antes da aplicação do losartan e nos diferentes tempos de aplicação do mesmo, comparando entre eles e também com o controle.
- Identificar, através da técnica de imuno-histoquímica, se houve alteração na expressão da proteína distrofina na membrana das fibras esqueléticas dos animais submetidos à terapia com Losartan e do controle.
- Avaliar a quantidade de tecido conjuntivo (fibrose muscular), antes da aplicação do Losartan e nos diferentes tempos de aplicação do mesmo, comparando entre os animais e também com o controle.

- Acompanhar a evolução das alterações músculo esqueléticas da doença por meio de avaliações de Amplitude de movimento articular e Circunferência dos membros nos diferentes tempos de aplicação do Losartan.
- Relacionar os achados moleculares e morfológicos com os dados das avaliações músculo esquelética dos animais GRMD tratados e não tratados com Losartan, antes e depois da aplicação do medicamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto proposto foi conduzido após aprovação pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), protocolo número 1175/2007.

A colônia de cães GRMD – Brasil, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Cirurgia – Setor de Anatomia, possui dezenove animais afetados pela distrofia muscular homóloga à Distrofia Muscular de Duchenne encontrada em humanos, estes com idades compreendidas entre sete e trinta e nove meses de idade, destinados à terapia medicamentosa e celular para a Distrofia Muscular. Além destes possuiu ainda dezenove fêmeas portadoras, destinadas à reprodução.

4.1 Delineamento experimental

Foram selecionados cinco cães adultos da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular de Duchenne (GRMD), sendo três cães machos (um deles controle) e duas fêmeas, pertencentes ao grupo de animais do canil GRMD Brasil localizado no Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, coordenado pela Profa. Dra. Maria Angélica Miglino (Quadro 1).

NOMES	TATUAGEM	NASCIMENTO	PESO	GRUPO
Bis	2L2	11/04/06	19kg	Controle
Suflair	3H10	15/04/06	26kg	experimental
Lucky	CH5	24/02/05	21kg	experimental
Traquinas	1X1	09/04/06	19kg	experimental
Lola	3H6	15/04/06	25kg	experimental

Quadro 1 –Animais selecionados do Canil GRMD Brasil/ USP para a pesquisa

Os critérios de seleção do estudo foram: animais distróficos adultos, que não estivessem participando de outro estudo e nem usando outra medicação. Todos os animais eram mantidos sob condições adequadas de cuidados médicos veterinários, alimentação, higiene e recreação.

Devido ao número restrito de cães para o estudo, um animal foi considerado controle (2L2) dos outros quatro, para avaliação da progressão da doença. Os quatro animais experimentais foram comparados entre si, e com o controle, nos tempos antes (T0) e após os diferentes tempos de uso do medicamento (Tf).

Os animais foram avaliados no primeiro momento determinado como tempo zero (T0), antes de iniciar administração do medicamento, em Maio de 2008 com os protocolos e parâmetros de avaliação descritos abaixo, e foram reavaliados após aplicação do Losartan. O animal CH5 recebeu o medicamento durante seis meses, o animal 3H6 e 3H10 durante quatro meses e o animal 1X1 durante dois meses, tendo os mesmos parâmetros do T0 avaliados pelo mesmo examinador.

4.2 Estudo Piloto

Antes do início do experimento, foi realizado um estudo piloto com um animal adulto do sexo masculino (CH5), data de nascimento (24/02/05) do canil GRMD para estipular dosagem do medicamento e reações adversas do mesmo.

Foi realizado biopsia no T0 (antes de começar com medicamento) com a finalidade de avaliar a morfologia das fibras musculares e também verificar por meio de imuno-histoquímica a presença de TGF-beta 1 antes e após o tratamento com o Losartan. Foi iniciado com o medicamento no dia 03/10/07. A dosagem inicial do Losartan foi de 12,5mg, dobrando a intensidade em intervalos de dois meses, até chegar na dosagem final estipulada de 50mg.

Os principais efeitos adversos a longo prazo do Losartan, verificados em estudo duplo cego de Goal (1996) com 2800 pacientes humanos portadores de hipertensão severa, estão descritos no quadro 2. Para identificá-los e também com o objetivo de acompanhar a evolução da doença nos cães tratados, foi instituído exame clínico semanal de acordo com ficha clínica estipulado pelos médicos veterinários do Canil GRMD – USP (Figura 1).

EFEITOS ADVERSOS
Dores de cabeça (14,1 %)
Infecções das vias aéreas superiores (6,5%)
Tonturas (4,1%)
Astenia/fadiga (3,8%)
Tosse (3,1%)

Quadro 2– Efeitos adversos do Losartan

Canil GRMD - USP
Ficha de Avaliação Clínica

[illegible]

Figura 1 - Ficha clínica utilizada para avaliação semanal dos animais

4.3 Protocolo de uso do Losartan

O protocolo para uso do Losartan foi estabelecido depois de realizado estudo piloto em um dos cães distróficos e com referência em experimentos previamente feitos em cães e humanos usando o Losartan, porém com outra finalidade (HASHIMOTO et al., 1999; SUZUKI et al., 2001; WAGSTAFF, 1996; WONG et al., 1991; GOA).

A dose estipulada foi de 50mg, uma vez ao dia, via oral nos quatro cães experimentais.

4.4 Parâmetros de Avaliação

Todos os animais foram avaliados no T0 e após a aplicação do Losartan, no tempo final do experimento (Tf), com parâmetros que buscaram levantar dados sobre: A Amplitude de movimento articular (ADM), a fim de acompanhar a evolução da patologia através dos encurtamentos musculares e contraturas articulares; Perimetria, para avaliar o ganho ou perda de massa muscular e aferição da Pressão Arterial, para verificar se não ocorria hipotensão devido ao efeito vasodilatador do medicamento Losartan.

4.4.1 Avaliação da amplitude de movimento articular ou Goniometria

Foram avaliadas no T0 e Tf as articulações do membro pélvico, como as articulações do quadril, joelho e tarso, e do membro torácico, como as articulações do ombro, cotovelo e carpo, a fim de acompanhar a evolução da fibrose muscular, sabendo que esta, quando aumentada, pode levar a uma diminuição da amplitude de movimento. Os dados foram coletados com um goniômetro universal médio da marca ISP. Os animais foram posicionados em decúbito lateral, confortavelmente, e a ADM medida a partir do ponto de flexão máxima da articulação avaliada, até a extensão máxima, através da movimentação passiva e lenta da articulação pelo avaliador.

Os animais não receberam sedação durante a coleta dos dados para permitir a expressão normal de dor. O centro do goniômetro foi posicionado em cada eixo articular durante as medidas. Os braços distais e proximais do goniômetro foram posicionados nas marcações anatômicas selecionadas dos membros (Figura 2).

Figura 2 - Avaliação da amplitude de movimento articular usando o goniômetro

4.4.2 Avaliação da Circunferência do membro ou Perimetria

Foram avaliados no T0 e Tf os grupos musculares dos segmentos da coxa e perna bilateralmente do membro pélvico, com intuito de analisar a massa muscular

dos animais, verificando se houve ganho, manutenção ou perda da massa muscular, antes e após a aplicação do Losartan. Foi utilizada uma fita métrica padrão posicionado no ventre muscular do músculo avaliado. Tanto para a perimetria, quanto para a goniometria foram realizadas três medidas consecutivas de cada membro e achado a média. Para análise dos valores de goniometria e perimetria, os dados do membro esquerdo e direito foram expressos em média e desvio padrão.

4.4.3 Biópsia muscular

A coleta dos fragmentos musculares foi retirada do ventre do músculo bíceps femoral do membro pélvico, alternando o lado direito e esquerdo de cada um dos cães (experimental e controle), antes de iniciar a terapia com o Losartan (tempo inicial) e ao final do protocolo terapêutico (tempo final) com a finalidade de avaliar a morfologia das fibras musculares dos cães tratados e do controle e também verificar por meio de imuno-histoquímica a expressão do TGF-beta1 nos dois momentos da avaliação. Foi realizada biópsia do tipo aberta e retirado um fragmento de 1x 2 cm² (Figura 3). Após canulação venosa e fluidoterapia de manutenção, os animais foram submetidos ao seguinte protocolo anestésico: associação Maleato de Acepromazina + Cloridrato de Tramadol (0,05 mg/kg e 2mg/kg, respectivamente) via intramuscular. Anestesia local infiltrativa à base de Cloridrato de Lidocaina 2% sem vasoconstrictor (7mg/kg) para incisão de pele, divulsão de tecido subcutâneo e fascia muscular. No momento da coleta do fragmento muscular será administrado Propofol (2,5 mg/kg) via intravenosa. No pós-operatório imediato foi utilizada Dipirona (25mg/kg) e Carprofeno (2,2mg/kg), ambos via intravenosa. A analgesia mediata e de manutenção foi conduzida a partir da utilização dos mesmos fármacos administrados por via oral durante 3 a 5 dias. Foi utilizada antibioticoterapia à base de Cefalexina (20mg/Kg) BID, por 7 dias.

Figura 3 – **A e B**: Coleta do músculo bíceps femoral durante procedimento de biópsia muscular

4.4.4 Protocolo Histológico – Morfometria

Os fragmentos musculares coletados a partir de biópsia aberta (T0 e Tf) de cada animal foram incluídos em Paraplast, corados com Picrossírius para identificação do colágeno entre as fibras musculares. Os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% durante um período superior a 24 horas. Em seguida, foram desidratados em série crescente de etanol (70 a 100%) para desidratação e xilol para diafanização, utilizando-se procedimento convencional, para inclusão em Paraplast® (Leica/Germany), confeccionando-se blocos retangulares com base de 3x4 cm.

Foram realizados cortes de 5µm em micrótomo (Leica RM 2065) para obtenção das lâminas, e posteriormente desparafinizados em estufa a 60°C por 2 horas. Utilizou-se a coloração de Hematoxilina e Eosina para análise estrutural e das características histopatológicas do músculo distrófico, e a de Picrossírius para identificação e quantificação das fibras colágenas musculares. As laminas foram fotomicrografadas em Microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc, utilizando-se o software Zeiss® KS 400.

Para a quantificação do colágeno muscular, foram padronizadas 10 fotos de cada corte de cada animal referentes aos dois tempos: T0 e Tf. Foram analisados um corte em cada lâmina, com objetiva de 40x, que possui área total por campo de 149774 micrômetros quadrados (μm^2). A área ocupada pelas fibras colágenas em cada imagem foi mensurada por um programa de histomorfometria específico do software Zeiss® KS 400. Os valores das áreas de colágeno obtidos nos 10 campos de cada corte foram somados e em seguida foi calculada a porcentagem de colágeno em relação à área total dos 10 campos ($2246610,0 \mu\text{m}^2$). Os cálculos foram feitos segundo a fórmula: *(Somatório das mensurações) x (área total analisada)⁻¹ x 100 = porcentagem de fibra de colágeno por área.*

4.4.5 Protocolos de Imuno-histoquímica (IHC)

Foram utilizados dois protocolos de imuno-histoquímica como mostrado abaixo.

4.4.5.1 Protocolo Imuno-histoquímica (IHC) para o TGF-beta 1

Foi estipulado protocolo de imuno-histoquímica (IHC) para avaliação do TGF-beta1 no músculo dos cães distróficos. Como o Losartan pode levar a inibição do TGF-beta1, que por sua vez está relacionado com o aumento da fibrose, pretendemos verificar através da imuno-histoquímica a resposta desse medicamento na musculatura esquelética dos cães GRMD.

A imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos de 5 μm de espessura, dispostos em lâminas previamente tratadas com poli-D-lisina. Depois de desparafinizados, os cortes foram hidratados em TBS 5mM.Triton X-100 0,1%, TBS 5mM, pH 7,4 e tratados com H₂O₂ 3% diluído em metanol para inativação de peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram lavados com H₂O destilada, receberam TBS, TBS 5mM.BSA 0,1%, e depois tratados com hialuronidase diluída

em tampão acetato para a recuperação do antígeno. Após estes procedimentos, os cortes foram lavados com TBS 5mM.BSA 0,1% para em seguida receberem o soro de cabra 40% diluído com TBS 5mM.BSA 0,1%. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário policlonal (rabbit anti TGF- β 1 Imprint, 1:100) *overnight* a 4°C, o controle negativo não recebeu o anticorpo primário. Os cortes, inclusive o controle negativo, foram incubados 2 h TA com anticorpo secundário (biotinylated goat anti-rabbit, Jackson Immunoresearch) e em seguida com o complexo estreptavidina-peroxidase (Jackson Immunoresearch 10 μ g/mL 1 h TA). As lâminas foram reveladas com diaminobenzidina (DAB 0,05%- Dako) e contracoradas com Hematoxilina de Mayer.

4.4.5.2 Protocolo Imuno-histoquímica (IHC) para a Distrofina

Cortes da espessura de 5 μ m foram fixados em laminas previamente silanizadas. As laminas foram desparafinadas em estufa a 37°C por 24 horas, seguido de protocolo de desparafinização e desidratação em xilol e alcoóis. Foi realizado bloqueio com peroxidase a 3% em álcool etílico absoluto. Seguiu-se a uma lavagem em água destilada, e as laminas foram feridas em tampão citrato por 14 minutos em microondas na potência de 80%. Em seguida, deixou-se que as laminas esfriassem dentro do próprio tampão e foram lavadas em água destilada sob agitação. Foi realizado bloqueio de proteínas inespecíficas com Protein Block (Dako) por 45 minutos em câmara úmida. Retirou-se o excesso de Protein block e o anticorpo primário DYS-1 (Novocastra) na diluição de 1:10 foi aplicado em apenas um corte *overnight*, deixando outro como controle negativo (PBS) afim de avaliarmos a eficácia do protocolo e descartamos os testes falso-positivos. No dia seguinte, as laminas foram lavadas três vezes de cinco minutos com PBS, e o anticorpo secundário vimentina-sptreptavidina (LSAB⁺-Dako) foi aplicado nos dois cortes de cada lamina deixando-os reagir 45 minutos cada. A revelação foi realizada por kit DAB⁺ (Dako), e as laminas coradas com hematoxilina e novamente desidratadas em bateria de alcoóis e xilol.

4.4.6 Pressão Arterial (P.A.)

A P.A foi aferida utilizando aparelho Doppler vascular portátil modelo DV2001, antes de iniciar com o Losartan para se obter os valores iniciais do cão sem o medicamento. Após dado início ao experimento a P.A foi aferida semanalmente durante o primeiro mês, passando depois a ser aferida quinzenalmente. Caso fosse verificado um quadro de hipotensão a dosagem do medicamento seria ajustada (Figura 4).

Como valor normal de referência para P.A, considerou-se a pressão sistólica entre 160-180 mm Hg (BROWN; HENIK, 1998).

Figura 4 - Aferição da P.A usando o Doppler

4.5 Exames laboratoriais

Foram realizados os exames de urina, hemograma e bioquímica.

4.5.1 Exame de Urina

A urina foi obtida por micção espontânea ou sondagem vesical. Cada amostra de urina foi avaliada fisicamente quanto à cor, aspecto, odor e densidade; este ultimo em refratômetro com limite Maximo de mensuração de 1,040. O exame químico foi realizado pela imersão rápida de fita reagente especifica para urinálise (Combur - 10®, Roche) e leitura contra padrão de cores estabelecido pelo fabricante, depois de ocorrido um minuto. A sedimentoscopia foi realizada após a amostra ser centrifugada a 200 g por 10 minutos (Centrifuga Excelsa Baby II, Fanem), segundo técnica rotineiramente empregada pelo Laboratório de Análise Clínicas do Departamento de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.5.2 Hemograma, bioquímicas sérica e urinária

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

Para contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas foi utilizado aparelho de uso veterinário (Contador hematológico modelo ABX Vet). O exame diferencial dos leucócitos e avaliação morfológica das hemácias e leucócitos foram realizados em esfregaços de sangue corados pelo método de Rosenfeld, observados em aumento de 500 vezes em microscópio (modelo Jenamed 2 Carl Zeiss).

As análises bioquímicas foram realizadas em analisador automático (Liasys, Roche) utilizando “Kits” comerciais. Essas análises envolveram as determinações das concentrações séricas de uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), creatina quinase (CK), gama-glutamil transferase (GGT), proteína total, albumina, cálcio, fosforo, sódio, potássio e colesterol (Quadro 3).

Parâmetros Analisados	Análises laboratoriais		
	Urina	Sangue	Soro
Hemograma (hemo)	-	Contagem total Hemoglobina Hematócrito Diferencial de leucócitos Contagem total de plaquetas	-
Perfil Hepático	-	-	Fosfatase Alcalina Alaninaminotransferase Aspartatoaminotransferase Creatina Quinase Proteína Total Albumina Bilirrubinas
Urinálise (urina)	Análise físico-química Sedimentoscopia	-	-
Perfil Complementar	-	-	Uréia Creatinina Cálcio Fósforo Sódio Potássio Colesterol

Quadro 3 – Sumário dos parâmetros a serem analisados em correspondência com as análises laboratoriais

4.6 Análise Estatística

A diferença entre as médias encontradas para os valores da Amplitude de Movimento Articular e Perimetria dos animais distróficos tratados e do controle, foi calculada através do teste *t de Student*. Estabeleceu-se grau de confiança de 95% e os valores considerados estatisticamente diferentes para *p value* < 0,05.

A média (μm^2) encontrada para cada um dos animais, em relação à área de colágeno, foi comparada com a média do T0 e do Tf de cada animal e com a média entre os animais. Foi utilizado Análise de Variância com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

Os resultados foram divididos entre os do estudo piloto e do experimento.

5.1 Piloto

Durante estudo piloto com um dos animais distróficos (CH5), a dosagem inicial usada nos dois primeiros meses do Losartan foi de 12,5mg (Outubro à Novembro de 2007), tendo como referência o peso dos animais que é de aproximadamente 20kg com a dosagem já estipulada em humanos. Como não foi verificado efeito adverso que pudesse interferir no protocolo terapêutico a ser implantado, após dois meses a dose foi aumentada para 25mg (durante período de Dezembro à Janeiro de 2008), passando para 37,5mg (Fevereiro à Março de 2008), até chegar a dosagem final de 50mg, que teve início em 19 de Março de 2008, sendo avaliado um mês com essa dosagem (Março a Abril). Esse mesmo animal usado no estudo piloto foi incluído no grupo experimental, sendo acompanhado desde o início da dosagem de 50mg (Março de 2008) até completar seis meses do tempo com o medicamento (Agosto de 2008), tempo que foi realizada a última biopsia referente ao tempo final do experimento (Tf).

A pressão arterial (PA) foi aferida com intuito de verificar se esta mantinha valores normais ou se mostrava valores inferiores ao normal, durante a aplicação do medicamento, já que o Losartan por ser um vasodilator podia resultar na queda da pressão arterial.

A pressão arterial antes de iniciar com Losartan foi aferida em dois dias diferentes para se obter os valores de referencia daquele animal, obtendo valores de 13x10 mmHg e 12x90 mmHg respectivamente. Durante o primeiro mês de cada mudança de dose, a PA foi aferida semanalmente, passando depois a ser feita quinzenalmente. O mesmo critério foi feito para os exames laboratoriais: bioquímico, hemograma completo (tabelas 1, 2 e 3) e urina.. Durante todo o tempo do

experimento os valores da PA (sistólica) ficaram entre 13, 14 e 15 mmHg, não apresentando valores que indicassem quadro de hipotensão.

Durante exame clínico realizado semanalmente, de acordo com ficha clínica estipulado pelos médicos veterinários do Canil GRMD-USP, não foi observada nenhuma alteração relevante que pudesse ser evidenciada pelo uso do Losartan, justificando o aumento da dosagem.

As principais alterações no exame bioquímico observado nesse cão do estudo piloto foram aumento nos valores de ALT, CK e AST. Os valores variaram de 452 a 19690 UI/L para CK, 151 a 299,9 UI/L para ALT e 139,7 a 512,4 UI/L para AST (Gráficos 1, 2 e 3), tendo como base a variação normal dos valores de 10 a 200 de CK, até 50 de ALT e até 40 de AST (Gráficos 1 a 3).

Gráfico 1- Concentrações médias de CK (U/L) do animal CH5 durante administração do Losartan. Outubro de 2007 a Abril de 2008

Gráfico 2- Concentrações médias de ALT (U/L) do animal CH5 durante administração do Losartan. Outubro de 2007 a Abril de 2008

Gráfico 3- Concentrações médias de AST (U/L) do animal CH5 durante administração do Losartan. Outubro de 2007 a Abril de 2008

Os valores de potássio, uréia e creatinina se mantiveram com média entre 4,5 e 5,9 mEq/l, 25,8 a 51,2 mEq/l e 0,73 a 1,1mg/ dl respectivamente, tendo como base a variação normal dos valores de 3,8 a 5,2 de potássio, 40 de uréia e 1,5 a 2,0 de creatinina (Gráficos 4 a 6).

Gráfico 4- Concentrações médias de Potássio mEq/l do animal CH5 durante administração do Losartan. Outubro de 2007 a Abril de 2008

Gráfico 5- Concentrações médias de Uréia mEq/l do animal CH5 durante administração do Losartan. Outubro de 2007 a Abril de 2008

Gráfico 6- Concentrações médias de Creatinina mg/ do animal CH5 durante administração do Losartan. Outubro de 2007 a Abril de 2008

Tabela 1- Média e Desvio padrão dos exames de bioquímica do cão CH5 no tempo zero e ao longo do estudo piloto

	Uréia (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	Ptns t. (g/dL)	Album (g/dL)	CK (UI/L)	AST (UI/L)	Ca (mg/d)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)
Média	39,5	0,9	6,2	3,2	7828,4	271,9	10,2	4,4	146,2	5
Desvpad	7,2	0,1	0,4	0,3	4473,7	101,6	0,7	0,7	3	0,3
Valores referência*	Até 40	Até 1,5-2,0	5,5-8,5	2,7-4,6	10-200	Até 40	7,5-11,3	2,1-6,3	135-145	3,8-5,2

*Valores de referencia para cães adultos. Laboratório de patologia clinica- HOVET- USP

Creat: Creatinina; Ptns. t.: proteínas totais; Album.: Albumina; CK: creatina quinase; AST :aspartato aminotransferase ; Ca: cálcio; P: fósforo; Na: sódio; k: potássio

Tabela 2- Média e Desvio padrão dos exames de Leucograma e contagem de plaquetas do cão CH5 no T0 e ao longo do estudo piloto

	Leuc. (μL^{-1})	Segm. (μL^{-1})	Eos. (μL^{-1})	Bas. (μL^{-1})	linf tip. (μL^{-1})	Mon. (μL^{-1})	Plaquetas
Média	12576,9	7660,4	940,8	0	3070,2	480,5	544076,9
Desvpad	2738,5	2881,1	524,7	0	777,5	232,1	45657,8
Valores referência*	6000-15000	3000-11800	0-750	raros	1500-5000	0-800	200-500mil

*Valores de referencia para cães adultos. Laboratório de patologia clinica- HOVET- USP

Leuc: Leucócitos ; Segm: segmentados; Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; Linf tip.: linfócitos típicos; Mon.: monócitos

Tabela 3- Eritrograma do cão CH5 durante T0 e ao longo do estudo piloto

	Hm ($\times 10^6 \mu\text{L}$)	Ht (%)	Hb (g/dL)	VCM (μm^3)	HCM (μm^3)	CHCM (%)
Média	5,1	36,8	12,5	72	24,3	33,8
Desvpad	0,3	2,1	0,7	2,8	0,9	0,9
Valores referência*	5,0-8,0	37-54	12,0-18,0	60,0-77,0	22,0-27,0	31,0-36,0

*Valores de referencia para cães adultos. Laboratório de patologia Clinica- HOVET- USP

Hm: Hemácia; Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

5.1.1 Exame de urina

Durante exames de urina do estudo piloto, o animal apresentou na maioria deles proteinúria e hemoglobínúria à administração do Losartan. Não se observou alterações quanto à presença de glicose, corpos cetônicos, urobilinogênio na urina (Tabela 4).

No exame do sedimento urinário, a descamação das vias urinárias foi vista na maioria dos exames realizados, enquanto os cristais urinários estavam presentes em quatro dos exames avaliados, apresentando fosfato triplo. A contagem de hemácias apresentou valores entre 0 e 25 e os leucócitos entre 0 e 17. Quanto a presença de bactérias, todos os exames apresentaram pelo menos uma cruz (+) durante os quinze exames avaliados (Tabela 5).

Tabela 4- Exame de urina tipo I do cão piloto CH5 de acordo com as semanas de tratamento com o Losartan

Exame de Urina											
Semanas	Odor	Aspecto	Cor	Ph	Densid.	Ptns.	Glicose	Corp cet.	Urobilin.	pig biliar	Hb
0	sui gen	Turvo	amar citr	8	1042	+	-	-	-	-	++
1	sui gen	Límpido	amar ouro	8,5	1046	-	-	-	-	+	-
2	sui gen	Turv	amar ouro	7,5	1047	+	-	-	-	++	+++
3	sui gen	lig turv	amar ouro	7,5	1045	+	-	-	-	++	+
4	sui gen	Turvo	amar ouro	8,5	>1050	+	-	-	-	+	-
6	sui gen	lig turv	amar ouro	8	1047	-	-	-	-	++	-
8	sui gen	Turv	amar ouro	7,5	>1050	+	-	-	-	+++	++
10	sui gen	Lig turvo	amar ouro	7	>1050	+	-	-	-	++	-
12	sui gen	Turvo	Amar Ouro	8	1045	+	-	-	-	-	-
14	sui gen	Turvo	Amar ouro	8,5	1050	+	-	-	-	++	++
16	Aliaceo	Turvo	Amar citr	6	1050	+	-	-	-	-	+
18	Aliaceo	Lig turvo	Amar ouro	8	>1050	+	-	-	-	-	(+)
20	sui gen	Lig turvo	Amar ouro	7	>1050	+	-	-	-	++	+++
22	Sui gen	Turvo	Amar ouro	7,5	>1050	+	-	-	-	++	+++
24	Sui gen	Lig turvo	Amar ouro	8,5	1043	+	-	-	-	+	+++

Densid: Densidade; Amar: amarelo; Ptns :proteínas ; Corp cet: corpos cetonicos;
 Urobilin:urobilinogênio; pig biliar: pigmento biliar; Hb: hemoglobina

Tabela 5- Exame de sedimento urinário do cão piloto CH5 de acordo com as semanas de tratamento com o Losartan

Sedimento urinário											
Sem anas	Hm	Leuc.	Ept ren.	Pelv ren.	Desc v. u.	Trans bex.	Cristais	Gran.	Hial.	Cer.	Bact.
0	20-25	13 a 17	-	(+)	+	-	-	-	-	-	(+)
1	0 a 2	0-2	-	-	Raras	-	-	-	-	-	(+)
2	20 a 25	13 a 17	+	+	+	-	-	-	-	-	+
3	2 a 4	6 a 8	+	+	(+)	-	-	-	-	-	(+)
4	0-2	8 a 10	+	++	+	-	Fosf tripl +	-	-	-	(+)
6	0-2	6 a 8	(+)	-	(+)	-	-	-	+	-	(+)
8	8-10	2-4	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+
10	0-2	4-6	-	(+)	+	-	-	-	-	-	+
12	0-2	2-4	-	+	(+)	-	-	-	-	-	+
14	8-10	4-6	++	+	+	-	Fosf tripl+	-	-	-	+
16	6-8	0-2	-	+	Raras	(+)	-	-	-	-	(+)
18	6-8	8-10	-	-	(+)	-	Fosf.tripl+ +	-	-	-	(+)
20	13-17	2-4	+	+	+	-	Fosf tripl+	-	-	-	+
22	20-25	2-4	(+)	-	+	-	-	-	-	-	+
24	8-10	6-8	-	(+)	+	-	-	-	-	-	(+)

Hm: Hemácias; Leuc: leucócitos; Ept ren: epitélio renal; Pelv ren: pelve renal; Desc v.u: descamação de vias urinárias; Trans bex: transição da bexiga; Gran: cilindros granulados; Hial: cilindros hialinos; Cer cilindros céreos; Bact: bactérias.

5.2 Experimento

Depois de finalizado o estudo piloto, foi dado início ao experimento com os quatro animais em Maio de 2008.

O animal CH5 recebeu o Losartan durante seis meses (Março a Agosto de 2008) sendo avaliado o segundo e sexto mês com o Losartan (Biopsias feitas em Maio e Agosto de 2008), os animais 3H6 e o 3H10 receberam Losartan por quatro meses (Maio a Setembro de 2008) e o animal 1X1 recebeu o Losartan por dois meses (Maio a Julho de 2008).

Foi realizado uma biopsia no T0, antes de iniciar com medicamento e no Tf de cada um dos animais, a fim de avaliar a morfologia das fibras musculares e também verificar por meio de imuno-histoquímica a expressão de TGF-beta 1 nesses dois tempos. Foram também realizados os exames laboratoriais (bioquímico, hemograma completo), aferição da P.A, avaliação de perimetria, goniometria e quantificação do colágeno.

5.2.1 Exame clínico

Para avaliação semanal dos cães foi utilizada a ficha clínica padronizada pelos Médicos Veterinários do Canil GRMD – USP (Figura 1). Cada animal possui uma ficha individual, onde são avaliados: estado nutricional, temperatura retal, auscultação cardiopulmonar, palpação abdominal, avaliação de mucosas e palpação de linfonodos, de modo a identificar eventuais efeitos adversos do uso da droga e, também, com o objetivo de acompanhar a evolução clínica da doença nos cães tratados.

Durante o experimento, não foi observada nenhuma alteração relevante que pudesse ser evidenciada pelo uso do Losartan.

A aferição da pressão arterial dos animais foi realizada antes de iniciar o tratamento com o Losartan (T0) para verificar os valores de referência de cada

animal e durante uso do medicamento, sendo os dois primeiros meses avaliados quinzenalmente e os meses seguintes mensalmente. Foram obtidos três valores (sistólica) e feito a média para cada tempo (Quadro 4).

Como valor normal de referência para P.A, considerou-se a pressão sistólica entre 160-180 mm Hg (BROWN; HENIK, 1998).

	CH5	2L2 (controle)	3H6	1X1	3H10
T0	13 /14/15	19/20/20	20/20/20	18/19/19	15/15/15
1 ^o mês/quinzena1	14/15/15	18/21/21	18/18/18	16/16/16	21/22/22
1 ^o mês/quinzena2	15/15/16	18/18/18	21/22/22	20/21/21	18/18/18
2 ^o mês/quinzena1	18/18/18	19/19/20	19/19/20	18/18/19	14/14/15
2 ^o mês/quinzena2	15/15/16	19/20/20	15/16/16	19/19/20	22/22/24
3 ^o mês	14/15/16	20/21/20	17/18/20	*	17/18/18

*óbito

Quadro 4- Valores da P.A dos animais nos T0 e Tf.

5.2.2 Exames de sangue

As principais alterações no exame bioquímico observado nesses cães foram aumento nos valores de ALT, CK e AST, quando comparados aos valores de

referência para cães normais adultos, embora em cães distróficos esses valores já estejam aumentados, como mostrados também no animal piloto.

Os valores de **CK** variaram de 5893 a 10586,2 UI/L para o animal **2L2**; 1254 a 26749,6 UI/L para **3H10**; 5674,5 a 15034,4 UI/L para **3H6**; 1858,2 a 18846 UI/L para **1X1** e 5360,6 a 19690 UI/L para **CH5**.

Os valores de **ALT** variaram de 255,1 a 371,8 UI/L para **2L2**; 298,9 a 402,9 UI/L para **3H10**; 258,1 a 422, 1 UI/L para **3H6**; 255,8 a 636, 4 UI/L para **1X1** e 158,8 a 299,9 UI/L para **CH5**.

Os valores de **AST** variaram de 144,7 a 230, 4 UI/L para **2L2**; 186,8 a 606,3 UI/L para **3H10**; 155,2 a 326,6UI/L para **3H6**; 63,4 a 495,4 UI/L para **1X1** e 163,3 a 423 UI/L para **CH5**.

As tabelas a seguir mostram a variação mensal dos parâmetros de bioquímica sérica e hemograma dos cães GRMDs durante o período com o Losartan e também do animal controle, além dos valores de referência para animais normais adultos (Tabelas 6 a 9).

Tabela 6 - Média $\pm$ Desvio padrão dos exames de bioquímica dos cães 2L2 (controle), 3H10, 3H6 e 1X1 ao longo do tempo de tratamento com o Losartan

Animais	Ureia (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Ptns.t (g/dL)	Albu m (g/dL)	CK (UI/L)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)
2L2	50,5 $\pm$ 13, 1	0,9 $\pm$ 0,1	6,8 $\pm$ 0, 4	3,4 $\pm$ 0, 1	8763,3 $\pm$ 1911,6	184,5 $\pm$ 31,3	299,6 $\pm$ 38, 2
3H10	34,3 $\pm$ 8,3	0,7 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0, 8	3,4 $\pm$ 0, 3	12575,7 $\pm$ 7712,6	363,6 $\pm$ 147, 1	404,3 $\pm$ 16 2
3H6	36,1 $\pm$ 6,7	0,7 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0, 1	3,2 $\pm$ 0, 2	17633,2 $\pm$ 22988, 3	221,4 $\pm$ 69,3	325,6 $\pm$ 62, 2
CH5	34,8 $\pm$ 7,6	0,8 $\pm$ 0,0 7	6,4 $\pm$ 0, 3	3,2 $\pm$ 0, 1	11772,7 $\pm$ 3946,6	310,7 $\pm$ 79,7	249,6 $\pm$ 45, 4
1X1	32,3 $\pm$ 3	0,8 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0, 7	3,3 $\pm$ 0, 5	10577,4 $\pm$ 6769,1	311,4 $\pm$ 188, 8	467,9 $\pm$ 15 9
valores referência*	Até 40	Até 1,5- 2,0	5,5-8,5	2,7-4,6	10-200	Até 40	Até 50

*Valores de referencia para cães adultos. Laboratório de patologia Clinica- HOVET- USP
Creat: creatinina; Ptns. t: proteínas totais; Album: albumina; CK: creatina quinase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase .

Tabela 7- Média $\pm$ Desvio padrão dos íons dos exames de bioquímica dos cães 2L2 (controle), 3H10, 3H6 e 1X1 ao longo do tempo de tratamento com o Losartan

Animais	Cálcio (mg/dL)	Potássio (mEq/L)	Fósforo (mg/dL)	Sódio (mEq/L)
2L2	10,1 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,6	148,2 $\pm$ 2,8
3H10	10,1 $\pm$ 1	5 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,7	145,7 $\pm$ 2,7
CH5	10,2 $\pm$ 0,9	5 $\pm$ 0,3	4 $\pm$ 0,7	146,5 $\pm$ 3,5
3H6	9,9 $\pm$ 1,4	5,4 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,8	145 $\pm$ 2,1
1X1	9,6 $\pm$ 0,6	5 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,9	146,4 $\pm$ 2,8
valores referência*	7,5-11,3	3,8-5,2	2,1-6,3	135-145

*Valores de referencia para cães adultos. Laboratório de patologia Clinica- HOVET- USP
Ca: Cálcio; K: potássio; P: fósforo; Na: sódio.

Tabela 8- Média e Desvio padrão dos exames de Leucograma dos cães 2L2 (controle), 3H10, 3H6 e 1X1 ao longo do periodo de tratamento com o Losartan

Animais	Leuc (µL)	Segm (µL)	Eos (µL)	Linf.Tip (µL)	Mon (µL)
2L2	19850±2639,3	13826,5±2420,1	586,4±237,4	4660,1±842	752,6±348,4
3H10	16000±850,2	9122,1±867,5	1242±496	5373±1151,9	261,151,3
CH5	13400±1796,2	7562,9±3055,9	1003±477	3275±789	470±264
3H6	18125±2149,9	10783,8±2269,5	1334±239	5477,8±792,9	509,3±185,8
1X1	19250±3985,3	13154,7±4210,9	569,7±493,6	9455,8±10449,9	569,8±460,2
valores referência *	6000-15000	3000-11800	0-750	1500-5000	0-800

*Valores de referencia para cães adultos. Laboratório de patologia Clinica- HOVET- USP
 Leu: Leucócitos; Neut: neutrófilos; Segm: segmentados; Eos: eosinófilos; Linf tip: linfócitos típicos;
 Mon: monócitos.C

Tabela 9- Média e Desvio padrão dos exames de Eritograma dos cães 2L2 (controle), 3H10, 3H6 e 1X1 ao longo do periodo de tratamento com o Losartan

Animais	Hm (x 10 ⁶ µl)	Ht (%)	Hb (g/dL)	VCM (µm ³)	HCM (µm ³)	CHC (%)
2L2	5,4±0,3	37,8±1,7	13,1±0,7	69,1±4,2	24,4±0,6	34,7±0,9
3H10	5,6±0,4	39,8±2,4	13,8±0,9	68,3±1,4	23,6±0,9	34,6±0,8
CH5	5,7±0,3	37,7±1,8	12,8±0,8	70,4±1,5	23,9±0,5	34±1
3H6	5,6±0,4	39,8±2,4	13,8±0,9	71,6±1	24,9±0,5	34,7±0,8
1X1	6,0±0,3	40,8±1,8	14,3±1,1	68,4±0,9	23,9±0,6	34,9-1,1
valores referência*	5,0-8,0	37-54	12,0-18,0	60,0-77,0	22,0-27,0	31,0- 36,0

*Valores de referencia para cães adultos. Laboratório de patologia Clinica- HOVET- USP
 Hm: Hemácias; Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina ; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

5.2.3 Morfologia da fibra muscular

Antes de iniciar a oferta do medicamento foi realizada biopsia para avaliar a morfologia das fibras musculares, bem como verificar mediante a técnica de imunohistoquímica a expressão de TGF-beta 1 e da distrofina dos cinco animais.

A análise histológica do músculo distrófico revela um padrão difuso da patologia caracterizado pela degeneração, sendo possível identificar áreas de infiltração de células inflamatórias com substituição por tecido adiposo e conjuntivo (Figura 6-B).

Diferente do músculo esquelético normal, no qual as fibras musculares são relativamente de tamanho homogêneo, uniformemente espaçadas e angulares, com os núcleos localizados na periferia da célula (Figura 6-A), os cortes histológicos do músculo distrófico apresentam variação no tamanho e formato das fibras, com alguns núcleos localizados no centro das mesmas (Figura 6B).

A morfologia das fibras musculares antes de iniciar o tratamento com o Losartan apresentava-se mais desorganizada e com maior quantidade de tecido fibroso ao redor das fibras (Figura 6-C). Após o Tf pode-se observar, em um dos cães estudados, uma melhor organização das fibras musculares e menor quantidade de tecido conjuntivo ao seu redor (Figura 6-D).

Figura 6- Fotomicrografia de músculo bíceps femoral. **A:** músculo de cão sadio evidenciando arquitetura muscular organizada com núcleos localizados na periferia das fibras (*). **B:** músculo de cão distrófico com fibras de diferentes diâmetros (▶), infiltrado inflamatório (→) e núcelos centrais (*). **C:** músculo de cão distrófico em T0. Fibras desorganizadas com presença de processo inflamatório infiltrativo (→) e significativa deposição de tecido conjuntivo (c). **D:** biopsia no Tf. As fibras estão mais organizadas e com menos infiltrados inflamatórios (→) e tecido conjuntivo (c). Coloração: HE, aumento: A e B: Barra = 50 μ m; C e D: Barra = 25 μ m

5.2.4 Quantificação do Colágeno

Os valores obtidos após a mensuração da área do colágeno nos cortes microscópicos da musculatura esquelética dos cinco animais GRMD, sendo um desses animais utilizado para controle, foram descritos em forma de porcentagem em relação à medida do campo total.

O percentual de colágeno no Tf foi estatisticamente menor do que o T0, quando comparado esses dois tempos em cada animal e quando comparado os resultados entre os diferentes animais (Tabela 10).

Tabela 10- Porcentagens da área de colágeno muscular em relação à área muscular total para cada um dos animais distróficos no T0 e Tf expressos em %

	T0	Tf
2L2 (controle)	15,7	12,2
CH5	5,5	3,3
3H6	5,4	0.9
3H10	23	12
1X1	15,7	12.2

teste... considerando $p < 0.05$

As figuras abaixo ilustram cortes transversais corados com picrossírius e fixados em Bouin, que caracterizam a coloração amarelada das fibras musculares, e o colágeno aparece em vermelho (Figura 7).

Figura 7 – Fotomicrografia de músculo bíceps femoral. **A:** músculo de cão distrófico (CH5), corado com coloração de Picrosirius, evidenciando colágeno em região de endomísio e perimísio (→). **B:** Fotomicrografia polarizada desse mesmo cão. **C:** cão distrófico (3H6) no T0, evidenciando maior presença de tecido conjuntivo (→). **D:** cão 3H6 no Tf com menor deposição de tecido conjuntivo (→). Barra= 25 μ m

5.2.5 Imuno-histoquímica (IHC)

O protocolo de IHC para avaliação do TGF-beta1 foi estabelecido primeiramente no animal do estudo piloto. Foram feitos cortes de fragmentos do músculo bíceps femoral, coletados dos membros pélvicos direito e esquerdo, alternadamente, nos momentos T0 e Tf do tratamento com Losartan, para analisar a expressão do TGF-beta1 na musculatura esquelética dos cães GRMDs.

Ao analisar as imagens dos animais do grupo experimental no T0, observa-se que existe uma maior marcação do TGF-beta1 quando comparado com o Tf. Observa-se que as regiões ao redor das fibras musculares, onde há presença de colágeno, são bastante marcadas, porém, nota-se também a presença do TGF-beta1 em regiões de endomísio e perimísio.

As imagens mostram na seqüência a marcação do anticorpo TGF-beta1 no músculo esquelético distrófico dos cães controle e tratados com Losartan (Figuras 8 e 9).

Figura 8- Imuno-histoquímica para localização do TGF-beta1 em cortes transversais do músculo bíceps femoral. **A:** controle negativo, barra = 25μm. **B:** controle negativo, aumento 40x. **C:** T0 do cão distrófico- controle (2L2). **D:** Tf. **E:** T0 do cão distrófico (1X1) evidenciando a marcação do TGF (em marrom) em endomísio (*) e tecido conjuntivo (→). **F:** Tf. Barra = 25 μm

Figura 9- Imuno-histoquímica para localização do TGF-beta1 em cortes transversais do músculo bíceps femoral. **A:** T0 do cão distrófico (CH5). **B:** Tf. **C:** T0 do cão distrófico (3H10). **D:** Tf. **E:** T0 do cão distrófico (3H6). **F:** Tf. Barra = 25 μ m

Os mesmos cortes de fragmentos do músculo bíceps femoral retirados para a IHC do TGF-beta1 foram utilizados para analisar a expressão da distrofina na musculatura esquelética dos cães GRMDs.

Ao analisar as imagens abaixo dos animais do grupo experimental no T0 e no T1 e do animal controle não foi possível observar marcação para proteína distrofina. Diferente do músculo de um animal normal onde essa proteína está presente (Figuras 10 e 11).

Figura 10- Imuno-histoquímica para localização da distrofina em cortes transversais do músculo bíceps femoral. **A:** cão sadio, evidenciando a marcação da distrofina (em marrom) na periferia da membrana sarcoplasmática das fibras. **B:** controle negativo. **C:** T0 do cão controle (2L2). **D:** Tf. **E:** T0 do cão 1X1. **F:** Tf. Barra = 25μm

Figura 11- Imuno-histoquímica para localização da distrofina em cortes transversais do músculo bíceps femoral. **A:** T0 do cão CH5. **B:**Tf. **C:** T0 do cão 3H10 **D:** Tf. **E:** T0 do cão 3H6. **F:** Tf. Barra = 25µm

5.2.6 Avaliação da Amplitude de movimento articular ou Goniometria

Foram descritos os valores em graus da Amplitude de Movimento (ADM) máxima de flexo-extensão das articulações do cotovelo, carpo, joelho e tarso, antes de iniciar o experimento (T0), e, após o período de administração do Losartan, assim como do animal controle.

O animal 1X1 não pôde ter seus dados de goniometria e perimetria avaliados, pois foi a óbito antes de realizar a última avaliação, devido à própria evolução da doença.

Os valores obtidos da avaliação da ADM dos três animais distróficos (3H6, 3H10 e CH5) no T0 foram comparados com a média dos valores da ADM de cada animal no seu Tf (sendo o animal CH5 com dois e seis meses de tratamento, os animais 3H10 e 3H6 com quatro meses de uso do Losartan) (Figuras 12 a 16).

Não foi encontrada diferença significativa entre as médias das articulações do joelho, tarso e carpo, dos animais distróficos durante o T0 e o Tf ($p > 0,05$).

Figura 12- Médias das ADM das articulações do cotovelo, carpo, joelho e Tarso do animal controle 2L2

Figura 13 - Médias das ADM das articulações do cotovelo, carpo, joelho e tarso do animal CH5 nos tempos zero e com dois meses de losartan

Figura 14- Médias das ADM das articulações do cotovelo, carpo, joelho e tarso do animal CH5 nos tempos zero e com seis meses de losartan

Figura 15- Médias das ADM das articulações do cotovelo, carpo, joelho e tarso do animal 3H10 nos T0 e Tf

Figura 16- Médias das ADM das articulações do cotovelo, carpo, joelho e tarso do animal 3H6 nos T0 e Tf

5.2.7 Circunferência do membro ou Perimetria

Foram avaliados, os grupos musculares dos segmentos do membro torácico (braço e antebraço) e do membro pélvico (coxa e perna), bilateralmente de todos os animais.

Os valores obtidos da avaliação da perimetria dos quatro animais distróficos no T0 foram comparados com a média dos valores da perimetria de cada animal no seu Tf. O animal CH5 foi avaliado em dois diferentes tempos: com dois e seis meses

de tratamento mediante biopsias realizadas com 2 meses e no final de 6 meses de tratamento. Os animais 3H10 e 3H6 foram avaliados com quatro meses de uso do Losartan (Figuras 17 a 21).

Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias dos segmentos do braço, antebraço, coxa e perna dos animais distróficos durante o T0 e o Tf ($p > 0,05$).

Figura 17 - Médias da perimetria dos músculos do braço, antebraço, coxa e perna respectivamente, do animal controle 2L2

Figura 18 - Médias da perimetria dos músculos do braço, antebraço, coxa e perna respectivamente, do cão CH5 nos tempos zero e com dois meses de Losartan (Tf)

Figura 19 - Médias da perimetria dos músculos do braço, antebraço, coxa e perna respectivamente, do cão CH5 nos tempos zero e com seis meses de Losartan (Tf).

Figura 20 - Médias da perimetria dos músculos do braço, antebraço, coxa e perna respectivamente, do cão 3H10 nos T0 e Tf

Figura 21 - Médias da perimetria dos músculos do braço, antebraço, coxa e perna respectivamente, do cão 3H6 nos T0 e Tf

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi avaliado o efeito do Losartan, como função de inibidor do TGF-beta 1, sobre o desenvolvimento da fibrose na musculatura esquelética do modelo canino GRMD.

Observando os resultados encontrados entre os grupos de animais experimentais e o controle, nota-se que os exames laboratoriais e clínicos (pressão arterial) se mantiveram com valores bem aproximados.

Os valores da pressão arterial dos animais experimentais durante o estudo se mostraram relativamente iguais aos valores do tempo zero, não sendo constatado quadro de hipotensão referente ao uso do Losartan.

Os exames de bioquímica sérica dos animais distróficos de ambos os grupos experimental e controle, mostraram aumento nos níveis séricos das enzimas CK, ALT e AST quando comparados aos mesmos valores em animais normais. O aumento dessas três enzimas está associado às lesões hepáticas, do músculo esquelético e do miocárdio (VALENTINE et al., 1990). Segundo Anderson (1982) e Walton (1988), em decorrência das anormalidades estruturais e funcionais da membrana celular, ocorre um aumento de enzimas séricas em pacientes portadores de distrofias. A dosagem dos níveis dessas enzimas, principalmente da CK é utilizada no diagnóstico da DMD e também no diagnóstico diferencial entre as formas de distrofias musculares progressivas. Elevadas concentrações destas enzimas são realmente notadas na deficiência da distrofina em camundongos *mdx*, cães GRMD e humanos, devido à destruição do sarcolema.

Embora o decréscimo nos níveis séricos de CK ofereça evidências bioquímicas e funcionais de uma melhora da função muscular nos cães GRMD (BOGDANOVICH et al., 2002), tanto nos achados de Cohn et al. (2007) quanto na nossa pesquisa, não houve relação do Losartan com decréscimos nos níveis de CK. Como os valores das enzimas já estavam altos antes de iniciar o tratamento com o Losartan e mantiveram altos no animal controle, desta forma, o Losartan na dose estipulada para estes animais, não interferiu nos níveis, já elevados, de CK, ALT e AST.

O tratamento com Losartan, pelo fato de ser um inibidor de angiotensina, está relacionado com a queda nos níveis de aldosterona. Portanto, os pacientes podem apresentar aumento nos níveis de potássio, uréia e creatinina. Porém, em pacientes hipertensos com função renal normal, o aumento desses valores foi irrelevante (MAZZOLAI; BURNIER, 1999).

Durante o estudo, os animais mantiveram esses valores dentro dos parâmetros de normalidade. Apenas um animal apresentou pico do valor do potássio durante um curto intervalo de tempo, logo retornando aos valores normais.

Segundo Goa (1996), a função renal está preservada durante administração do Losartan em humanos. A frequência de filtração glomerular, o fluxo sanguíneo renal, o volume urinário ou outros parâmetros renais não foram alterados em paciente normais recebendo dosagem única de 100 mg, assim como em pacientes com hipertensão, os quais receberam 50 mg do Losartan diariamente, por períodos de sete dias a um ano.

Em pacientes com disfunção renal a excreção da creatinina também não foi alterada durante a terapia com Losartan durante 1 a 12 semanas. A excreção dos eletrólitos urinários (incluindo o sódio e potássio) em indivíduos normais apresentava-se aumentada ou inalterada, enquanto que a uricosuria era normal.

Nos exames de urina, o animal do estudo piloto apresentou proteinúria moderada em todos os exames realizados. Segundo Bush (2004) esses resultados podem ocorrer na insuficiência renal, estresse, doenças infecciosas e na hematúria. A hemoglobínúria estava presente na maioria dos exames deste cão, a qual poderia estar relacionada às hemácias lisadas. Assim como a descamação presente nas vias urinárias durante os exames, a hemoglobínúria pode ser explicada também pela forma de colheita utilizada, ou seja, a cateterização.

Em relação às investigações histopatológicas do músculo, observamos no T0, que as fibras musculares não apresentam-se uniformemente espaçadas, relativamente do mesmo tamanho como aquelas encontradas no músculo esquelético normal, tais quais as relatadas por Erazo- Torricelli (2004). Elas estavam hipertrofiadas ou atrofiadas, apresentando um formato mais arredondado, seguidas de concomitante heterogeneidade do diâmetro das mesmas. Este achado soma-se aos relatos de Milhorat et al. (1966) e Valentine et al. (1986).

Para Valentine et al. (1990) investigações histopatológicas nos músculos de cães GRMD revelam necrose precoce de fibras, e regeneração associada com fibrose endomisial e perimisial. Disto resulta severa miopatia, similar ao processo que ocorre na DMD. A infiltração de neutrófilos e macrófagos aparece no interior das fibras musculares necrosadas, e, ao redor de vasos sanguíneos, ilustrando a penetração destas células no tecido muscular.

O aumento do tamanho da fibra muscular se deve a um mecanismo compensatório tardio para mitigar a perda funcional das fibras nesses cães GRMD (PASSERINI et al; 2002). De acordo com Nguyen e colaboradores (2002), as fibras de músculos distróficos apresentam núcleo central indicando estagio tardio de regeneração, juntamente com áreas de fibrose endomisial.

Foi possível observar em um animal desse estudo mediante técnica histológica do músculo esquelético, que após o tratamento com o Losartan (Tf) foi verificada melhora na organização das fibras musculares, como demonstrado em imagem do músculo esquelético.

Em termos de degeneração miopática, o modelo GRMD é o que mais se assemelha a DMD, e também o mais indicado para desenvolvimento de testes terapêuticos, como alternativa para a doença em humanos. O estudo do processo de formação de fibrose nestes animais é importante, uma vez que a restauração da função da distrofina em DMD só se torna possível com o controle efetivo da fibrose (PASSERINI et al., 2002).

De acordo com Valentine et al. (1990) o desenvolvimento gradual da fibrose endomisial e perimisial é uma característica comum de humanos e cães do modelo GRMD, porém ausente no camundongo *mdx*. Os autores sugerem que o aumento do colágeno intersticial pode interferir no metabolismo muscular normal resultando em uma regeneração anormal e diminuindo a perfusão vascular, re-inervação e ainda, impor restrições mecânicas.

Em alguns cortes histológicos foi possível identificar no perímio muscular a presença de fibroblastos entremeados a um tecido conjuntivo abundante, indicando a importância destas células na fisiopatologia da distrofia muscular, uma vez que temos a substituição do músculo lesado pelo tecido fibroso constituído por fibras colágenas.

No presente trabalho, foi estudada a fibrose a partir da quantificação das fibras colágenas no tecido muscular e pela expressão do TGF-beta1 em nível molecular e suas correlações.

Comparando a quantidade, em porcentagem, de tecido fibroso durante o T0 e Tf, podemos observar uma diminuição na média entre o tempo antes e após o tratamento com Losartan em todos os cães experimentais, inclusive o controle, o que dificulta afirmar que o Losartan tenha conseguido inibir o TGF-beta1 que por sua vez, diminuiu a proliferação de tecido conjuntivo na musculatura esquelética.

Cohn et al. (2007) comparando camundongos *mdx* tratados e não tratados com Losartan durante 6-9 meses, observaram um decréscimo na deposição do colágeno no diafragma.

É importante lembrar que durante este estudo, cuidados especiais foram tomados em relação à quantificação de colágeno, para excluir as áreas que representassem artefatos e pudessem assim confundir com as áreas de fibrose.

Embora a fibrose não seja evidenciada no primeiro mês de vida dos cães distróficos, as anormalidades encontradas na musculatura tais como fibras hipercontraturadas, macrófagos antes do nascimento, ou seja, este microambiente patológico podem contribuir para a síntese e ativação dos fatores fibrogênicos, tais como os TGF-beta1 (PASSERINI et al; 2002).

Embora todos os músculos dos cães distróficos apresentem deficiência de distrofina, os níveis de fibrose e a capacidade de regeneração e função variam entre os animais, sugerindo que a ausência de distrofina é necessária, porem não suficiente para determinar o padrão de extensão da fibrose (ANDERSON et al. 1988; PORTER et al. 2003). Esse dado justifica a variação do grau de fibrose encontrada entre os cães do estudo.

Para avaliar o importante papel do TGF-beta1 na dosagem do colágeno nesse estudo, procuramos neutralizar a via do TGF-beta1 através da administração do Losartan.

Estudos demonstraram que o TGF-beta1 está significativamente mais expresso no músculo de pacientes distróficos do que em controles, estando relacionado o grau de fibrose muscular com a idade do paciente (BERNASCONI et al; 1995).

Esse mesmo autor mostrou que a extensão da marcação positiva da imunohistoquímica para o TGF-beta1 varia de animal para animal, dado esse também encontrado nesse estudo. Embora mostrado no estudo de Passerine et al. (2002), que os tecidos conectivos perimisial e endomisial marcados para o TGF-beta1 foi mais evidente na fase inicial da doença, ele afirma que uma nova onda de síntese e ativação do TGF-beta1 pode ocorrer em adultos, possivelmente agindo para sustentar a fibrose presente na fase mais tardia, como ocorre nos cães desse estudo.

Porém, diferente dos achados de Passerine et al. (2002), os quais mostraram níveis de TGF-beta1 em GRMD adultos semelhantes aos cães normais, este estudo mostrou que a marcação de TGF-beta estava presente e aumentada nos cães GRMD adultos em estagio avançado de fibrose, suportando a idéia de que essa citocina está elevada não somente no inicio da fibrogênese.

Estudos mostrando a imunolocalização do TGF-beta em pacientes saudáveis, controles de todas as idades mostraram rara marcação e quando presente estava geralmente marcado nos capilares ou ocasionalmente presente no perimísio. Já os animais GRMD de todas as idades apresentaram marcação positiva em região do perimísio e endomisio próximo as áreas de fibras musculares desarranjadas. Aos 30 dias de vida a marcação do TGF- beta estava presente em áreas de tecido conjuntivo e nos GRMD adultos foi fortemente evidenciado em perimísio e endomisio (PASSERINI et al., 2002).

Em estudo feito por Bernasconi et al. (1999) os pacientes com miopatia, no caso a distrofia muscular congênita, a marcação do TGF-beta1 estava presente em perimísio e também no endomisio da maioria dos músculos dos pacientes.

No presente estudo a extensão de TGF-beta positivamente marcado estava também presente, em geral, em região de perimísio, endomísio e em áreas de tecido conjuntivo.

Os achados desse estudo usando bloqueador de TGF-beta como inibidor da fibrose, ou Losartan, junto com os achados de Gosselin et al. (2004) e Cohn et al. (2007), constituem evidências adicionais para o envolvimento do TGF-beta1 no desenvolvimento da fibrose. É importante lembrar que o tratamento com o Losartan

não elimina a citocina dos músculos, porém traz para níveis similares aos indivíduos saudáveis controles.

A diminuição da sinalização do TGF-beta1 evidenciada nas imagens de imuno-histoquímica após o período de uso do Losartan, juntamente com a diminuição da deposição de colágeno, sugerem um efeito inibitório do medicamento sobre essa citocina nos músculos dos cães GRMD estudados.

As imagens de imuno-histoquímica da distrofina não mostraram marcação em nenhum dos animais experimentais nos dois tempos nem do controle. Portanto, não se pode observar correlação da expressão da distrofina com a aplicação do Losartan, sendo que devido à doença essa proteína continua sendo ausente.

Dentre os métodos de avaliação utilizados, além da quantificação das áreas de colágeno e imuno-histoquímica, estão também a goniometria e perimetria como parâmetros de avaliação física. A perimetria e a goniometria são duas ferramentas frequentemente utilizadas pela fisioterapia em pacientes humanos. Suas aplicações foram validadas no modelo animal GRMD, obtendo medidas confiáveis e capazes de acompanhar a progressão da doença, trazendo alguma contribuição para a perda muscular e a deterioração da motilidade nos cães distróficos (JAEGER et al., 2002).

A amplitude de movimento articular (ADM) está relacionada com a deposição de colágeno nos músculos e tecidos adjacente. Normalmente, a movimentação constante dos segmentos corporais em si, mantém a flexibilidade dos tecidos moles periarticulares e a lubrificação da articulação com a produção de líquido sinovial. Platt e Garosi (2004) atribuem às contraturas musculares como a causa da limitação do movimento, característica das doenças musculares.

Os valores de ADM das articulações analisadas (cotovelo, carpo, joelho e tarso) nos cães do experimento, não mostraram alterações estatisticamente significantes. Porém, comparando as médias dos valores retratados nos gráficos no tempo após o uso do Losartan, com os valores iniciais, pudemos notar um discreto aumento da amplitude das articulações do joelho e tarso em todos os animais do experimento, inclusive do controle, o que dificulta a análise dos dados. Gaiad (2006) observou em seus estudos valores de ADM de tarso e joelho diminuídos em GRMD

adultos, porém, quando comparados aos valores de cães normais. Estes achados sugerem uma limitação do movimento causada por encurtamento muscular devido ao acúmulo de tecido conjuntivo característico da doença. Porém, não podemos inferir que a diminuição do colágeno encontrado nos Tf dos animais do nosso estudo, com o uso do Losartan, refletiu numa tendência a mobilidade das estruturas moles periarticulares destas articulações, visto que o animal controle apresentou aumento semelhante.

A amplitude articular do cotovelo também aumentou no Tf em todos os animais, com exceção do animal 3H6. Diferente dos achados de Gaiad (2006); Howell et al. (1997) e Kornegay et al. (1994), que encontraram valores aumentados para a amplitude de movimento do carpo em seus animais GRMD, nesse estudo o carpo se mostrou com valores menores ou iguais no animais experimentais e controle, no Tf.

De acordo com Kornegay et al. (1994), assim como os meninos com DMD apresentam contraturas que produzem limitações funcionais, muitas vezes mais importantes que a própria fraqueza muscular, contraturas articulares no animais GRMD alteram a conformação e restringem a marcha progressivamente, principalmente entre os três e seis meses de idade.

Para que os valores desse estudo sejam mais fidedignos, será necessário o acompanhamento em longo prazo da variação dessas articulações, com mais de um animal controle e as medidas feitas com mais de um avaliador.

Analisando os resultados da Perimetria no animal CH5 nos tempos com dois e seis meses de tratamento, observa-se aumento ou manutenção nas medidas de circunferência de todos os grupos musculares avaliados (braço, antebraço, coxa e perna). A medida do braço foi praticamente mantida nos animais 3H6 e 3H10 com quatro meses de Losartan, quando comparado com o controle, que teve essa medida diminuída ao longo de quatro meses. Porém, os valores de perimetria analisados não foram estatisticamente significantes.

As medidas dos segmentos do antebraço, coxa e perna tiveram variações distintas entre os animais 3H6 e 3H10. As discrepâncias observadas nos valores da perimetria podem ser explicadas pelas diferenças de fenótipos e sexo dos cães GRMDs avaliados no presente estudo.

As circunferências dos membros torácico e pélvicos não foram ainda descritas no modelo GRMD, porém, assim como a goniometria, elas são medidas de avaliação bastante usadas em humanos, e têm a finalidade de estabelecer a perda de massa muscular. Esse método de avaliação é amplamente usado na fisioterapia em pacientes portadores de disfunções, tais como as neuromusculares e consegue retratar de forma indireta a progressão da DMD.

Durante o estudo uma das fêmeas distróficas foi a óbito por insuficiência cardiorrespiratória súbita, devido ao curso natural da doença, já que apresentava os exames clínicos e laboratoriais estáveis. Dessa forma, foi avaliado apenas o tempo de dois meses com uso do Losartan.

Os parâmetros de avaliação citados acima para avaliar o efeito do Losartan no músculo distrófico dos cães não relatam uma diferença expressiva entre os animais do grupo experimental e do controle, já que tanto os valores da quantificação do colágeno, quanto os valores de goniometria mostraram semelhanças entre os dois grupos. Porém, quando comparado cada animal experimental no T0 com seu Tf, a diminuição tanto da quantidade de tecido fibroso e principalmente na marcação do TGF-beta, corroboram para um efeito benéfico do uso do Losartan nesses cães.

7 CONCLUSÕES

1 - Os achados suportam a idéia de que o tratamento em curto prazo (dois meses) com a dosagem de 50mg oral diária do Losartan possui efeito antifibrótico no músculo esquelético do modelo GRMD, além de ser bem tolerado.

2 - Uma vez que a fibrose parece ser resultado de diversos mecanismos envolvendo outras moléculas além do TGF-beta1, outras citocinas, ou fatores de crescimento podem estar envolvidos na prevenção e/u redução da fibrose tardia.

3- Estudos avaliando a influência do Losartan na musculatura esquelética devem ser acompanhados no GRMD desde idade pré-púbere e em prazo mais longo ("follow up"), usando um maior número de animais controles tanto distróficos quanto normais, para desta forma, buscar melhores resultados.

4 - A variabilidade fenotípica dos animais GRMD estudados dificulta a análise e comparação entre os animais e o animal controle.

5 - Os achados de amplitude de movimento articular e perimetria não mostraram relação direta com os achados da quantificação do colágeno e de imuno-histoquímica pelo fato de não terem sido estatisticamente significantes e apresentarem valores semelhantes com o do animal controle.

6 - Novas pesquisas poderão utilizar esses achados no modelo animal GRMD para elucidar influência e contribuição do Losartan no tratamento com crianças portadoras de DMD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R. E.; BOXHORN, L. K. Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor- beta. **J. Cell. Physiol**, v. 133, p. 567-572, 1987.

AMERICAN THORACIC SOCIETY DOCUMENTS. Respiratory care of the patient with duchenne muscular dystrophy. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 170, p. 456-465, 2004.

ANDERSON, JE.; BRESSLER, BH.; OVALLE, WK. Functional regeneration in the hindlimb skeletal muscle of the *mdx* mouse. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 9, p.499-515, 1988.

ANDREETTA, F.; BERNASCONI, P.; BAGGI, F.; FERRO, F.; OLIVA, V.; ARNOLDI, F. C.; MANTEGAZZA, R.; CONFALONIERI, P. Immunomodulation of TGF-Beta 1 in *mdx* mouse inhibits connective tissue proliferation in diaphragm but increases inflammatory response: implications for antifibrotic therapy. **J Neuroimmunol**, v. 175, p. 77-86, 2006.

ANSVED, T. Muscular dystrophies: influence of physical conditioning on the disease evolution. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 6, p. 435-439, 2003.

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. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 38, p. 255-261, 2002.

BERNASCONI, P.; DI BLASI, C.; MORA, M; MORANDI, L.; GALBIATI, S.; CONFALONIERI, P.; CORNELIO, F.; MANTEGAZZA. Transforming growth factor-beta1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. **Neuromuscular Disorders**, v. 9, p. 28-33, 1999.

BERNASCONI, P.; TORCHIANA, E.; CONFALONIERI, P.; BRUGNONI, R.; BARRESI, R.; MORA, M.; CORNELIO, F.; MORANDI, L.; MANTEGAZZA, R. Expression of transforming growth factor- β 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of fibrogenic cytokine. **J Clin Invest.**, v. 96, p. 1137-1144, 1995.

BOGDANOVICH, S.; KRAG, TO.; BARTON, ER.; MORRIS, LD.; WHITEMORE, LA.; AHIMA, RS.; KHURANA, TS. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. **Nature**, v. 420, p. 418-421, 2002.

BRIGUET, A.; COURDIER-FRUH, I.; FOSTER, M.; MEIER, T.; MAGVAR, JP. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, p. 675- 682, 2004.

BROWN, S. A.; HENIK, R. A. Diagnosis and treatment of systemic hypertension. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 28, n. 6, p. 1481-1494, 1998.

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

CAROMANO, F. A. Características do Portador de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD): Revisão. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 3, p. 211-218, 1999.

CHARGÉ, S. B.; RUDNICK, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 209-238, 2004.

CHEN, YW.; NAGARAJU, K.; BAKAY, M.; McINTYRE, O.; RAWAT, R.; SHI, R.; HOFFMAN, EP. Early onset of inflammation and later involvement of TGF-Beta in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 65, p. 826-834, 2005.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; PETROSKI, G. F.; MCDONALD, K.; KORNEGAY, J. N. Eccentric contractin injury in dystrophic canine muscle. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 83, p. 1572-1578, 2002.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; SULLIVAN, M. J.; KORNEGAY, M.J. Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of Duchenne muscular dystrophy. **Am. J. Phys. Med. Rehabil**, v. 80, p. 175-181, 2001.

CHILDERS, M. K.; STALEY, J. T.; KORNEGAY, J. N.; MCDONALD, K. S. Skinned single fibers from normal and dystrophin- deficient dogs incur comparable stretch-induced force deficits. **Muscle and Nerve**, v. 31, p. 768-771, 2005.

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. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 268, p. 1199-205, 1993.

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

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal model used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165-172, 2003.

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. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 14, p. 10-53, 1988.

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

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

DECONINCK N., DAN, B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **Pediatr Neurol**, 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. **Arch Fr Pediatr**, v. 40, p. 609-613, 1983.

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

FAVERZANI, S.; BLASEVICH, F.; CORNELIO, F.; POZZA, O.; MORA, M.; Development of muscle pathology in canine x- linked muscular dystrophy II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. **Acta Neuropathol**, v. 101, p. 469- 478, 2001.

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

GOA, K. L; WAGSTAFF A. J. Losartan Potassium. A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. **Drugs**, v. 51, p. 820- 845, 1996.

GOLDBERG, A. I.; DUNLAY, M. C.; SWEET, C. S. Safety and tolerability of losartan potassium, an angiotensin II receptor antagonist, compared with hydrochlorothiazide,

atenolol, felodipine ER, and angiotensin- converting enzyme inhibitors for the treatment of systemic hypertension. **Am. J. Cardiol.**, v. 75, p. 793-795, 1995.

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

HASHIMOTO, Y.; OHASHI, R.; MINAMI, R.; NARITA, H. Comparative study of TA-606, a novel angiotensin II receptor antagonist, with losartan in terms of species difference and orthostatic hypotension. **J. Pharmacol.**, v. 81, p. 63-72, 1999.

HEINO, J.; MASSAGUE, J. Cell adhesion to collagen and decreased myogenic gene expression implicated in the control of myogenesis by transforming growth factor beta. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 10181-10184, 1990.

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

ISHITOBI, M.; HAGINOYA, K.; ZHAO, Y.; OHNUMA, A.; MINATO, J.; YANAGISAWA, T.; TANABU, M.; KIKUCHI, M.; IINUMA, K. Elevated plasma levels of transforming growth factor beta 1 in patients with muscular dystrophy. **Neuroreport**, v. 11, p. 4033-4035, 2000.

JAEGGER, G.; MARCENLLIN- LITTLE, D. J. Reliability of goniometry in Labrador Retrievers. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 7, p. 979-986, 2002.

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

KHALIL, A.; TULLUS, K.; BAKHIET, M.; BURMAN, LG.; JAREMKO, G.; BRAUNER, A. Angiotensin II type 1 receptor antagonist (Losartan) down-regulates transforming growth factor-beta in experimental acute pyelonephritis. **The Journal of urology**, v. 164, p. 186-191, 2000.

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.

LEITÃO, A. V.; DURO, L. A.; PENQUE, G. M. Progressive muscular dystrophy- duchenne type. Controversies of the kinesitherapy treatment. **São Paulo Medical Jornal**, v. 113, n, 5, p. 995- 999, 1995.

LI, Y.; FOSTER, W.; DEASY, B. M; CHAN, Y.; PRISK, V.; TANG, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. Transforming growth factor – β 1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle. **Am. J. Pathol.**, v. 164, p. 1007-1019, 2004.

LUZ, M. A. M.; MARQUES, M. J.; SANTO NETO, H. Impaired regeneration of dystrophin- deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 691-695, 2002.

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

MAZZOLAI, L.; BURNIER, M. Comparative safety and tolerability of angiotensin II receptor antagonists. **Drug safety**, v. 21, p. 23-33, 1999.

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

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

OLSON, E. N.; STERNBERG, E.; HU, JS.; SPIZZ, G.; WILCOX, C. Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. **J cell Biol**, v. 103, p. 1799-805, 1996.

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

PASTORET, C.; SEBILLE, A. A mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **J neurol Sci**, v. 129, p. 97-105, 1995.

PLATT, S. R.; GAROSI, L. S. Neuromuscular weakness and collapse. **Veterinary Clinics Small animal practice**, v. 34, p. 1281–1305, 2004.

PORTER J. D.; MERRIAM A. P.; LEAHY P.; GONG B.; KHANNA S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficiente (*mdx*) mice. **Hum Mol Genet**, v. 12, p. 1813-1821, 2003.

REIMANN, J.; IRINTCHEV, A.; WERNING, A. Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and mdx mice. **Neuromuscul. Disor.**, v. 10, p. 276-282, 2000.

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. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 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.

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

STROBER, J. B. Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. The American Society for Experimental. **Neurotherapeutics**, v. 3, p. 225-234, 2006.

SUZUKI, J.; OHTA, H.; HANADA, K.; KAWAI, N.; IKEDA, T.; NAKAO, M.; IKEMOTO, F.; NISHIKIBE, M. Acute effects of E-3174, a human active metabolite of losartan , on the cardiovascular system in tachycardia-induced canine heart failure.

Hypertens Res., v. 24, p. 65-74, 2001.

SWEET, C.S.; NELSON, E. B. How well have animal studies with losartan predicted responses in humans?. **J. Hypertens**, v. 11, n. 3, p. 63-67, 1993. Supplemnt.

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

TKATCHENKO, A. V.; PIÉTU, G.; CROS, N.; GANNOUN-ZAKI, L.; AUFFRAY, C.; LÉGER, J. J.; DECHESNE C. A. Identification of altered gene expression in skeletal muscle from Duchenne muscular dystrophy patients. **Neuromuscular Disorder**, v. 11, p. 269- 277, 2001.

VALENTINE, B. A. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: A review. **Am. J. Med. Genetics**, v. 42, p. 352-356, 1992.

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

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

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 543-555, 2003.

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.

VIGNOS, P. J.; WAGNER, M. B.; KARLINCHAK, B.; KAIRJI, B. Evaluation of a program for long-term treatment of Duchenne muscular dystrophy. Experience at the University Hospitals of Cleveland. **The journal of bone and joint surgery American**, v. 78, n. 12, p. 1844-1852, 1996.

WANG, J.; FORST, J.; SCHODER, S.; SCHODER, M. Correlation of muscle fiber type measurements with clinical and molecular genetic data in Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 9, p. 150-158, 1999.

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

WONG, P. C.; HART, S. D.; DUNCIA, J. V.; TIMMERMANS, P. B. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Studies with DuP 753 and EXP3174 in dogs. **European Journal of Pharmacology**, v. 202, p. 323-330, 1991.

YAMAZAKI, M.; MINOTA, S.; SAKURAI, H.; YAMADA, A.; KANAZAWA, I.; KAWAI, M. Expression of transforming growth factor- β 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. **Am. J. Pathol.**, v. 144, p. 221- 226, 1994.

ZATZ, M.; FOTA-PESSOA, O. Distrofias Musculares. **Ciência Hoje**, v. 4, p. 26-32, 1986.