ANDRÉ GATTI

**Estudo da função glomerular em Golden Retrievers normais portadores e afetados pela
distrofia muscular progressiva (GRMD)**

São Paulo

2007

ANDRÉ GATTI

Estudo da função glomerular em Golden Retrievers normais, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD)

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

Orientador:

Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato

São Paulo

2007

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.1884
FMVZ

Gatti, André

Estudo da função glomerular em Golden Retrievers normais, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD) /

André Gatti. – São Paulo : A. Gatti, 2007.

97 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato.

1. Clearance. 2. Creatinina. 3. EDTA-cromo. 4. Medicina nuclear.
5. Distrofia muscular. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da função renal através do clearance de creatinina, clearance de ethylenediaminetetra-acetic acid, marcado com cromo 51 (^{51}Cr EDTA) da uréia e creatinina sérica em Golden Retrievers normais, portadores e afetados com distrofia muscular", protocolado sob o nº1017/2006, utilizando 27 (vinte e sete) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, 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 do dia 07/02/07".

(We certify that the Research "Evaluation of the renal function with creatinine clearance, ethylenediaminetetra-acetic acid linked with 51 chromium (^{51}Cr EDTA) and seric urea/creatinine in Golden Retriever muscular dystrophy", protocol number 1017/2006, utilizing 27 (twenty seven) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, 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 the day 02/07/2007).

São Paulo, 08 de fevereiro de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: **GATTI, André**

Título: Estudo da função glomerular em Golden Retrievers normais, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD)

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: ____/____/2007

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento _____

A minha mãe Sonia, que sempre lutou muito para que seus filhos pudessem estudar e se tornar pessoas de boa índole, que sempre me apoiou e me deu amor. Te amo!

Ao meu pai Maurício, por sempre ter me dado seu apoio.

A meu grande Amor Patricia, por ter compreendido a minha ausência em diversas ocasiões e por sempre ter me apoiado e incentivado, por sempre ter acreditado em mim e nunca ter me deixado desistir. Te amo muito!

A meu Avô Mário (in memórian) que foi mais que um pai e contribuiu muito na formação do meu caráter.

Agradecimentos

Ao professor Pedro Primo Bombonato, pela orientação neste trabalho, pela amizade e, sobretudo, pelo carinho com seus alunos.

Ao grande Amigo Fabio Marques Chefe da Radiofarmácia do Instituto de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Ao professor Benedicto Vladimir de Martim, pois sem ele nada disto teria acontecido.

Ao professor Carlos Alberto Buchpiguel, por ter permitido o desenvolvimento da pesquisa e a realização dos exames nas instalações do Instituto de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Ao professor Carlos Eduardo Ambrósio (Cajú), por ter sido meu co-orientador e ter me ajudado sempre que precisei.

Ao meu patrão Valter Hato que sempre me incentivou a estudar e serviu de exemplo em diversas ocasiões e por ter permitido que eu trocasse de horário para poder cumprir os créditos durante o mestrado.

Aos amigos da pós-graduação Andréia, Gabriela, Marcelo, Marcelo, João, Camila, Fernando, Renata, Evander, Carlos, pela amizade e os momentos compartilhados durante este período.

À equipe do canil GRMD - Brasil : Dani, Drica, Marininha, Cris, Carlinha, Thais, Alida, Juliana (Guará), Juliana, Matheus, Flávio (Maranhão), Marcelo (Rosas), Marã, Rosa e ao Augusto, pela amizade, pelos cuidados e carinho que todos sempre demonstraram com os cães e pelos momentos (bons e ruins) que passamos juntos durante os vários plantões.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Jaqueline, Maicon, Índio, João e Raimundo, por estarem sempre prontos a ajudar.

Ao meu cunhado Daniel por ter me ajudado com as fórmulas matemáticas.

A toda a minha família querida que sempre me apoiou.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

APELO DE UM CÃO

Trate-me gentilmente, meu querido amigo, pois nenhum coração em todo o mundo é mais agradecido pela amabilidade do que o meu coração amoroso.

Não machuque minha alma com pancadas, apesar disso, lambo suas mãos entre os golpes. Sua paciência e compreensão irão mais rapidamente ensinar-me coisas que eu devo aprender.

Fale comigo constantemente, porque sua voz é para mim a mais doce música do mundo, como você deve saber pelo abanar da minha cauda quando os meus ouvidos escutam os seus tão esperados passos.

Por favor, coloque-me para dentro quando estiver chovendo e com frio, pois sou um animal doméstico e não estou acostumado as intempéries.

Eu não tenho honra maior do que o privilégio de sentar-me aos seus pés.

Mantenha meu potinho cheio de água fresca, pois não posso dizer para você quando estou com sede.

Alimente-me com comida limpa para que eu possa estar bem e saudável para brincar, acompanhá-lo nas suas caminhadas e estar alerta e capaz de defendê-lo com a minha própria vida, se a sua estiver em perigo.

E, meu amigo, quando eu estiver muito velho, e não gozar mais de boa saúde, nem boa audição e visão, não faça esforços heróicos para manter-me aqui.

Por favor, perceba que minha vida dedicada está indo suavemente. Eu devo partir desta terra sabendo que a última respiração que eu arranquei deste meu ser esteve sempre a salvo em suas mãos.

Autoria Desconhecida

Aos cães do canil GRMD – Brasil, por todo o sofrimento por que passam para que possamos tentar uma melhor compreensão e quem sabe a cura desta terrível doença que acomete tanta de nossas crianças.

RESUMO

GATTI, A. **Estudo da função glomerular em Golden Retrievers normais, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD)** [Study of glomerular function in golden retrievers normals, carriers and affected by progressive muscular dystrophy (GRMD)]. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciencias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

As distrofias musculares em crianças e adolescentes acometem 1 em cada 3000 nascimentos. A distrofia de Duchenne é de origem genética e herança recessiva ligada ao cromossomo X, sendo determinada pela ausência da proteína distrofina, apresenta caráter invariavelmente progressivo, natureza mórbida e fim letal. Até o momento não se conhece tratamento efetivo, mesmo com todo o conhecimento que se tem da etiopatogenia. O objetivo deste estudo foi avaliar, no modelo animal, utilizando cães golden retrievers normais portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva, a existência de alterações na função glomerular, através da comparação entre os clearances de creatinina, clearance do radionuclídeo EDTA-cromo e da concentração sérica de uréia e creatinina. Os animais foram divididos em 3 grupos de 9 animais sendo grupo 1 controle, grupo 2 portador e grupo 3 afetados. Todos os animais foram submetidos ao mesmos protocolos de exames. Não foram identificadas alterações significativas entre os grupos ou individualmente, sendo que todos os resultados encontraram-se dentro dos limites de normalidade. Sendo assim lesões renais primárias, obscuras aos testes convencionais, descartando-se uma correlação entre a distrofia muscular e lesão na musculatura dos vasos renais que pudessem levar a alterações da função do órgão.

Palavras-chaves: Clearance, Creatinina, EDTA-cromo, Medicina nuclear, Distrofia muscular.

ABSTRACT

GATTI, A. Study of glomerular function in golden retrievers normals, carriers and affected by progressive muscular dystrophy (GRMD). 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The muscular dystrophies in children and teenagers is taken in 1 each 3000 births. The Duchenne's dystrophy is from genetics origin and recessive heritage linked to X chromosome, and also determined by the lack of dystrophin protein; it shows progressive characteristics, morbid nature and a lethal end. So far there is no known effective treatment, even with all the therapeutic knowledge. The goal of use of normal golden retriever dogs, being then carriers and affected by the progressive muscular dystrophy, the changing existence in the glomerular function through the comparison between the creatinine clearance, EDTA-creatinine clearance and serum urea and creatinine. Aiming the early diagnosis of the renal pathology. The animals were divided in 3 groups of 9 animals, being group 1 control animals, group 2 carriers animals and group 3 affected animals. All of them were submitted to the same examinations protocols. There was no relevant identification between the groups or either individually, as all the results were within the expected and natural limits. Likewise, renal primary wounds are not clear in traditional tests made in dystrophic animals, mainly caused by the muscular wounds in renal vessels harming this way the organ function.

Key words: Clearance, Creatinine, EDTA-creatinine, Nuclear Medicine, Muscular dystrophy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Média com desvio padrão do volume de urina na solução A.....	46
Figura 2 - Média com desvio padrão do volume de urina na solução B.....	48
Figura 3 - Média com desvio padrão da concentração de creatinina na urina da solução A....	50
Figura 4 - Média com desvio padrão da concentração de creatinina na urina da solução B....	52
Figura 5 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A (mL/min).....	54
Figura 6 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução B (mL/min).....	56
Figura 7 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A e Clearance de creatinina na solução B (mL/min).....	58
Figura 8 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A (mL/Kg/min).....	60
Figura 9 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução B (mL/Kg/min).....	62
Figura 10 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A e do Clearance de creatinina na solução B (mL/Kg/min)	64
Figura 11 - Clearance de EDTA-Cromo.....	66
Figura 12 - Média com desvio padrão da dosagem de uréia sérica.....	68

Figura 13 - Média com desvio padrão da dosagem de creatinina sérica.....	69
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média com desvio padrão do volume de urina na solução A.....	46
Tabela 2 - Média com desvio padrão do volume de urina na solução B.....	48
Tabela 3 - Média com desvio padrão da concentração de creatinina na urina da solução A...	50
Tabela 4 - Média com desvio padrão da concentração de creatinina na urina da solução B....	52
Tabela 5 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A (mL/min).....	54
Tabela 6 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução B (mL/min).....	56
Tabela 7 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A e clearance de creatinina na solução B (mL/min)	58
Tabela 8 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A (mL/Kg/min).	60
Tabela 9 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução B (mL/Kg/min).	62
Tabela 10 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A e do Clearance de creatinina na solução B (mL/Kg/min).....	64
Tabela 11 - Média com desvio padrão do clearance de EDTA-Cromo.....	66
Tabela 12 - Média com desvio padrão da dosagem de uréia sérica.....	68

Tabela 13 - Média com desvio padrão da dosagem de creatinina sérica.....69

Quadro 1 - Fórmulas matemáticas representando os resultados obtidos.....70

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Contador automático Perkin Elmen Precisely 1480 Automatic Gamma Counter Wizard™3 ” (utilizado para realizar a contagem de atividade radioativa nas amostras de Sangue).....	88
Apêndice B - Contador automático Perkin Elmen Precisely 1480 Automatic Gamma Counter Wizard™ 3 ”	89
Apêndice C – Amostras de sangue sendo analisadas pelo contador automático.....	90
Apêndice D – Animal afetado pela distrofia muscular progressiva.....	91
Apêndice E – Animal afetado pela distrofia muscular progressiva em fase terminal.....	92
Apêndice F – Animal afetado pela distrofia progressiva em plataforma utilizada para alimentação.....	93
Apêndice G - Planilha com a curva de decaimento da atividade plasmática de EDTA, expressando o valor do clearance de EDTA-Cr.....	94
Apêndice H – Planilha do Excel, com os resultados do Clearance de EDTA Cr.....	95
Apêndice I – Planilha de procedimentos utilizada na rotina da Clínica de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	96-97

ABREVIATURAS

A	- Grupo afetado
ABDIM	- Associação Brasileira de Distrofia muscular
BD	- Becton, Dickenson and Company
C	- Grupo controle
CK	- Creatino-quinase
Ccr	- Clearance de creatinina endógena
Cr	- Creatinina
⁵¹Cr-EDTA	- Cromo - 51 ethylenediaminetetra-acetic acid
CXMD	- Canine X-linked muscular dystrophy
DMB	- Distrofia Muscular do tipo Becker
DMC	- Distrofia Muscular do tipo Cinturas
DMD	- Distrofia Muscular do tipo Duchenne
DMP	- Distrofia Muscular Progressiva
DMPs	- Distrofias Musculares Progressivas
DMS	- Distrofia Muscular do tipo Steinert
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
FMVZ-USP	- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo
FSHD	- Facioscapulohumeral muscular dystrophy
GRN	- Golden Retriever Normal
GRMD	- Golden Retriever Muscular Dystrophy
HFMD	- Hipertrophic Feline Muscular Dystrophy
IPEN-SP	- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo

MDX	- X-linked murine dystrophy
mg	- Miligrama
mg/Kg	- Miligrama por quilo
mL	- Mililitro
P	- Grupo portador
TFG	- Taxa de Filtragem Glomerular
Ur	- Uréia
μCi	- Microcurie
⁹⁹Tc-DTPA	- Tecnécio – 99 diethylenetriaminepentaacetic
%	- Porcentagem
®	- Marca registrada
TM	- Trade Mark (Marca registrada)
%	- Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 Aspectos relacionados a Distrofia Muscular de Duchenne.....	26
2.2 Aspectos relacionados a função renal.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Animais.....	37
3.2 Radiofarmacos.....	38
3.3 Clearance de creatinina endógena.....	38
3.4 Clearance de EDTA-Cromo.....	38
3.5 Bioquímica sérica e urinária.....	39
3.6 Delineamento do experimento.....	39
3.7 Análise dos resultados.....	41
3.7.1 Método.....	41
3.7.1.2 Hipótese de igualdade entre os grupos.....	41
3.7.1.3 Análise de Variância (ANOVA).....	42
4 RESULTADOS.....	44

5 DISCUSSÃO.....	71
6 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICES.....	87

1 INTRODUÇÃO

As afecções renais em cães e gatos são consideradas um desafio na Medicina Veterinária, geralmente em muitas alterações o diagnóstico é feito tardiamente quando a extensão da lesão renal já esta muito avançada.

Os caninos domésticos são acometidos por diversas doenças renais que podem acarretar insuficiência funcional do órgão, porém isto não se traduz necessariamente em uma “insuficiência renal”, pois esta condição depende da quantidade de parênquima lesado e da severidade das lesões. (OSBORNE; FINCO, 1995).

A insuficiência renal primária pode ser determinada por várias doenças que levam ao não funcionamento de pelo menos três quartos dos néfrons de ambos os rins, quando não há hipertrofia compensatória. A diferenciação entre doença renal e insuficiência renal é importante para se adotar uma conduta terapêutica adequada para cada caso, uma vez que o tratamento para correção de um desequilíbrio hídrico, eletrolítico, ácido-básico, nutricional e endócrino em pacientes com insuficiência renal pode não ser adequado para o tratamento de pacientes com doença renal sem apresentar insuficiência (OSBORNE; FINCO, 1995).

Os dois parâmetros mais frequentemente utilizados para avaliar a função renal são as concentrações de uréia e creatinina plasmáticas, (BIEWENGA; VAN DEN BRON 1981), porém, estes parâmetros mostram-se insatisfatórios uma vez que só se acumulam significativamente no sangue quando já existem 50% ou mais de néfrons não funcionais (GRANERUS, 2000). Estes valores também podem sofrer influências extra-renais (MOE; HEIENE, 1995).

Diferentes pesquisadores têm calculado a taxa de filtração glomerular (TFG) através da diminuição das concentrações plasmáticas de radiofármacos que

apresentam filtração glomerular, como ^{99m}Tc -DTPA e ^{51}Cr EDTA. (FAWDREY et al. 1985; GLEADHILL et al. 1995; MOE; HEIENE, 1995)

As distrofias musculares em crianças e adolescentes acometem 1 em cada 3000 nascimento (EMERY, 1994), dentre as distrofias musculares a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é de origem genética e herança recessiva ligada ao cromossomo “X”, determinada pela ausência da proteína distrofina, que normalmente pode ser encontrada em vários tecidos e de maneira mais evidente na musculatura esquelética. De caráter invariavelmente progressivo, natureza mórbida e fim letal, a DMD ganhou grande importância nos meios científicos, principalmente porque todas as tentativas de tratamento não foram comprovadamente eficazes, mesmo com todo o entendimento que se tem da sua etiopatogenia. (BOGDANOVICH et al., 2004)

A ausência da proteína distrofina também é encontrada em outras espécies animais, como cães, gatos, ratos, peixes e invertebrados. Ainda que estas espécies apresentem fenótipos diferentes, devido a uma aparente resposta específica da ausência da distrofina em cada uma delas, estes modelos animais vêm sendo estudados na tentativa de se identificar um tratamento eficaz, através da integração dos achados. Segundo Vainzof et al. (2005), estudos realizados nos modelos animais são cruciais para aumentar os conhecimentos a respeito de doenças genéticas humanas e investigação de novas terapias experimentais.

O modelo animal mais comum para a Distrofia Muscular de Duchenne é o mdx mouse (COLLINS; MORGAN, 2003), devido a facilidade de manipulação do genoma murino (VAINZOF et al., 2005). Apesar do mdx ser um homólogo desta doença, o dano e a função muscular são comparativamente menos intensos do que em humanos, resultando em um tempo de sobrevida próximo do normal. A ausência de distrofina para o mdx é menos crítica para a função muscular do camundongo, que para os

humanos (COLLINS; MORGAN, 2003). Ainda, esse modelo apresenta um número de fibras revertentes, entre dois e três por cento, que passam a sintetizar novamente, de forma espontânea a distrofina (VAINZOF et al., 2005)

Segundo Shelton e Engvall (2005), os roedores são importantes fontes de estudo da patogênese e efeitos da manipulação genética e transplante celular, porém, os estudos com caninos e felinos vêm fornecendo dados de maior relevância clínica, uma vez que são modelos para o teste de novas terapias, avaliando os benefícios das mesmas em termos de função, tem sido o mais estudado (COLLINS; MORGAN, 2003). O modelo GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) apresenta as alterações musculares mais próximas daquela encontradas nos humanos, além de existir diversas similaridades entre os cães afetados e os pacientes portadores de DMD (HOWELL et al., 1997). Entre elas encontramos a atividade aumentada de CPK, atrofia muscular associadas a contraturas, necrose muscular, degeneração e mineralização com regeneração concomitante, fibrose do endomísio e perimísio e cardiomiopatias. Assim, como em pacientes portadores da DMD, cães jovens frequentemente morrem devido à parada cardíaca ou respiratória, ainda que muitos sobrevivam e alcancem alguns anos de vida (NGUYEN et al., 2002). Segundo Howell et al., (1997) alguns animais GRMD vivem por mais de seis anos de vida, com outros indo a óbito nos primeiros dias de vida, devido à forma “neonatal fulminante” da doença.

Um homólogo da DMD é também observado em diferentes raças de cães, como o Golden Retriever, Rottweiler, Pointer, Beagle e, dentre estas, o modelo de distrofia muscular no Golden Retriever.

Caso seja encontrada a ocorrência de alterações na filtração glomerular dos cães portadores ou afetados, pode-se sugerir a utilização do método para avaliação de

mulheres portadoras de distrofia muscular de Duchenne (DMD) com idade acima dos quarenta anos, visando detectar precocemente alterações na taxa de filtração glomerular.

Nesta pesquisa pretende-se estudar a função renal nos cães da raça Golden Retriever, normais, afetados e portadores de distrofia muscular, através da comparação entre os clearance de creatinina e do radionuclídeo $^{51}\text{CrEDTA}$ bem como através da avaliação da concentração sérica da uréia e creatinina, visando-se diagnosticar precocemente alterações e/ou doenças renais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS RELACIONADOS A DISTROFIA MUSCULAR TIPO DUCHENNE

As distrofias musculares progressivas (DMPs) são miopatias hereditárias, associadas à fraqueza muscular progressiva, destruição e regeneração das fibras musculares e substituição final das fibras por tecido conjuntivo fibroso e adiposo. (ENGEL, 1990; EMERY, 1994). Atualmente, são conhecidos mais de trinta tipos diferentes de distrofias musculares progressivas, porém avanços em estudos de biologia molecular sugerem que esse número possa ser ainda maior, sendo algumas benignas e outras mais graves, podendo atingir crianças e adultos de ambos os sexos; todas afetando a musculatura, porém diferenciando o grupo muscular acometido de acordo com o tipo de DMP. (ZATZ PASSOS BUENO, 1995; ABDIM, 2003;). Atualmente a classificação das distrofias é feita através do modo de herança, idade de início, rapidez de progressão, distribuição dos músculos afetados e achados associados nos músculos e outros órgãos. As principais DMP nos humanos são: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular do tipo Becker (DMB), Distrofia Muscular do Tipo Cinturas (DMC), Distrofia Miotônica de Steinert (DMS) e Distrofia Muscular Fácio-Escápulo-Umeral (FSH), sendo que a mais grave e a mais comum é a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). (ABDIM, 2003)

A distrofia muscular tipo Duchenne tem caráter mundial não havendo diferenças étnicas, nem geográficas na sua distribuição populacional. (NICHOLS et al., 1994; ZATZ; PASSO BUENO, 1995; BIBLIOMED, 2004)

A distrofia muscular de Duchenne é a mais comum desordem neuromuscular recessiva associada ao cromossomo “X”, onde cerca de 2/3 dos casos são herdados da mãe, que é chamada de portadora assintomática do gene, e nos 1/3 restantes dos casos ocorre nova mutação na criança com distrofia, sem que o gene tenha sido herdado (ABDIM, 2003; ERRINGTON et al., 2003). Portanto, cabe as mulheres apenas o papel de portadoras do gene mutante, sendo que até hoje foram descritos raríssimos casos de mulheres portadoras manifestas, com sinais e sintomas brandos ou alterações laboratoriais pouco significativas (BIBLIOMED, 2004). A distrofia tipo Duchenne é caracterizada pela ausência da proteína distrofina que causa degeneração progressiva do músculo esquelético cardíaco. As crianças afetadas locomovem-se por meio de cadeiras de rodas e geralmente vêm a óbito antes dos 30 anos de idade. (KORNEGAY et al., 1988; SHELTON et al., 2001; BERGMAN et al., 2002; CHILDERS et al., 2002; NGUYEN et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004, LIU et al., 2004;). As mulheres portadoras de DMD podem demonstrar fraqueza muscular e cardiomiopatia dilatada (HOOGERWAARD et al., 1999).

Esse tipo de distrofia se manifesta na idade de três a cinco anos através de dificuldade na atividade locomotora, hipertrofia das panturrilhas, baixa estatura, altos índices de atividade de creatino-quinase (LUI et al., 2004) e em algumas crianças retardamento mental.

A incapacidade de andar se verifica por volta dos 10 anos de idade, o óbito ocorre próximo dos trinta anos de idade e se dá normalmente devido à falência respiratória ou do músculo cardíaco (LUI et al., 2004).

Quanto à fisiopatologia da distrofia de Duchenne, sabe-se que ocorrem deleções, duplicações ou mutações de ponto na banda Xp21 do gene responsável pela síntese da proteína distrofina, localizado no braço curto do cromossomo X. (BERRY,

GASCHEN; AKERMAN, 1992; BIBLIOMED, 2004). A distrofina participa do arranjo citoesquelético do miócito, ligando este ao sarcolema da matriz extracelular. Portanto é uma proteína indispensável para o bom funcionamento do músculo esquelético em geral, uma vez que a sua ausência possibilita o influxo de cálcio e outras moléculas provenientes do líquido extracelular para o interior das fibras musculares, culminando com a necrose dessas fibras (BIBLIOMED, 2004). A DMD é então caracterizada por necrose e regeneração muscular. Eventualmente, a regeneração pode não prosseguir com a necrose, resultando em progressiva perda muscular. (NICHOLS et al., 1994).

Os primeiros sintomas da doença, nos humanos, são retardo do desenvolvimento, dificuldade para correr e subir escadas, quedas freqüentes e aumento das panturrilhas. (ENGEL, 1990; ZATZ; PASSO BUENO, 1995).

Após a perda da capacidade de deambulação, os músculos diminuem de tamanho e a fraqueza dos músculos paraespinais gera uma sifoescolióse progressiva; ocorre ainda fraqueza dos músculos respiratórios e formação de cicatrizes na região posterobasal do ventrículo esquerdo. (ENGEL, 1990). Os achados laboratoriais mais freqüentes são: aumento, muito acentuado, dos valores de creatino-quinase (CK), que chegam a estar cerca de vinte vezes o valor normal, esse aumento ocorre mais na fase inicial da doença, diminuindo à medida que poucas fibras musculares restam para serem destruídas. O diagnóstico definitivo é feito através do exame do DNA, e caso este seja negativo, deve-se realizar a biópsia muscular (de preferência da panturrilha) para a pesquisa da proteína distrofina através do método de Western-Blot. (BIBLIOMED, 2004).

O modelo animal mais utilizado para estudo da distrofia muscular de Duchenne é o camundongo mdx (X-linked murine dystrophy), no qual a homóloga mutação

também resulta em deficiência de distrofina. Assim como nos humanos os camundongos mdx tem recorrente necrose das fibras musculares; no entanto a regeneração é muito eficiente e os camundongos não sofrem perda generalizada de fibras musculares e fraqueza. O modelo canino da distrofia muscular de Duchenne denominado cxmd (canine X-linked muscular dystrophy), com similar mutação, pode ser superior ao camundongo, uma vez que o tamanho e os sintomas dos cães são muito próximos ao dos humanos. (NICHOLS et al., 1994).

A distrofia muscular ligada ao sexo e associada à deficiência de distrofina, tem sido registrada em várias raças de cães, mas é melhor caracterizada no Golden Retriever. (BERGGMAM, 2002). Howell et al. (1997) consideram os cães da raça Golden Retriever, afetados pela distrofia muscular denominados GRMD (Golden Retriever muscular Dystrophy), como excelentes modelos para o estudo da eficácia da geneterapia em miopatias por deficiência de distrofina, pois há muitas similaridades fenotípicas e genotípicas entre cães afetados e meninos com DMD. (SHELTON, 2001; NGUYEN et al. 2002).

Até bem pouco tempo as miopatias espontâneas nos animais, especialmente nos cães, eram consideradas raras. (MEIER, 1958 apud MCKERRELL, 2001, p 690). Atualmente já são reconhecidas mais de vinte miopatias caninas, fato este atribuído ao avanços nos métodos de investigação. (DUNCAN; GRIFFITHS, 1986 apud MCKERRELL, 2001, P. 690). A hereditariedade está presente em muitas dessas miopatias. Varias delas apresentam manifestações clínicas como: disfagia, regurgitação, megaesôfago (podendo levar à pneumonia aspirativa), anormalidades da marcha e redução na tolerância a exercícios. (MCKERRELL, 2001).

A distrofia muscular ligada ao cromossomo x dos Golden Retrievers (GRMD) é uma das mais drásticas dentre as miopatias que acometem os cães. (MCKERRELL,

2001). Como nos humanos, nos cães também falta a transcrição do gene de Duchenne e por consequência a proteína relacionada a distrofina. (SHELTON, 2001). Os sinais clínicos começam a se manifestar entre a sexta e oitava semana de idade, embora alterações patológicas nos músculos possam ser encontradas desde o nascimento. Os cães machos afetados cansam-se com facilidade, apresentam andadura alternante anormal, caracterizada por passadas rígidas e curtas; podem ainda apresentar redução na capacidade de abrir os maxilares e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos; a maior parte da musculatura esquelética torna-se atrofica, porém certos grupos musculares e a língua, apresentam-se com hipertrofia. (MCKERRELL, 2001). A morte espontânea em neonatos distróficos é comum nas duas primeiras semanas de vida porém ela normalmente ocorre por volta do seis meses; e caso os animais sobrevivam a este período de crise podem chegar a viver de três a cinco anos. (2002; SAMIEI, 2000; NGUYEN et al.).

A cardiomiopatia decorrente da DMD é comum tanto em humanos quanto em cães, porém os pacientes portadores de DMD acabam por vir a óbito devido à atrofia dos músculos respiratórios antes de desenvolverem cardiomiopatia. Outra diferença é que os cães podem continuar a movimentar-se com os precoces problemas musculares, uma vez que são quadrúpedes, mas os meninos afetados perdem a habilidade de ficarem eretos e precisam utilizar-se de cadeiras de rodas. (SAMIEI, 2000).

Brazeau et al., (1992) enfatizam que além de todas as alterações musculares, existe a possibilidade do acometimento de outros sistemas não musculares, no estado distrófico da doença. Em seu estudo para avaliação da eficácia de uma determinada droga que seria utilizada no tratamento das distrofias, observaram que os camundongos mdx estudados apresentaram indícios de disfunção hepática e renal baseados nas alterações séricas encontradas nos exames bioquímicos, bem como

durante a necropsia, pela diferença de peso desses órgãos em comparação com os órgãos de animais normais. Além desses autores, outros também relatam alterações em órgãos internos de humanos e animais distróficos. (BAROHN et al. 1988; MORIUCHI et al. 1993; MUSATELLI et al., 1994)

Myatake et al. (1989 apud BRAZEAU, 1992,p. 180) e Nowak et al. (1982 apud BRAZEAU, 1992, p. 180) observaram que pacientes com DMD apresentavam alterações patofisiológicas na motilidade gástrica.

Moriuchi et al. (1993) pesaram o coração, fígado e rins, de pacientes humanos com DMD, em autópsias, e observaram atrofia do fígado e do coração em pacientes com idade mais avançada e atrofia dos rins, somente em alguns pacientes que se apresentavam extremamente definhados.

Segundo Muscatelli et al. (1994) a hipoplasia congênita das glândulas adrenais pode ocorrer como parte de uma síndrome junto a distrofia muscular de Duchenne e/ou por deficiência de glicerol-quinase, sendo que o hipogonadismo hipogonadotrópico, freqüentemente, está associado a esta desordem. Ainda é incerto se há um único gene responsável por estas duas doenças, ou se são dois genes distintos. A deficiência de glicerol quinase, por sua vez, tem sido descrita isoladamente ou em complexos fenotípicos incluindo a hipoplasia congênita das glândulas adrenais e a distrofia muscular de Duchenne. Outros achados clínicos no complexo de deficiência de glicerol quinase são: retardamento mental, pequena estatura e hipogonadismo hipogonadotrópico. (PILLERS et al., 1990).

Berry; Gaschen e Akerman, (1992) encontraram alterações radiográficas e ultrassonográficas em vários órgãos de felinos com distrofia muscular hipertrófica, denominada HFMD (Hypertrophyc Feline Muscular Dystrophy), distrofia esta, considerada análoga à de Duchenne e à dos Golden Retrievers, uma vez que também

há ausência de distrofina no músculo (MCKERRELL, 2001). Foram por eles observadas as seguintes alterações: hepatoesplenomegalia, renomegalia, efusão peritoneal, mineralização das glândulas adrenais, espessamento da porção muscular do diafragma, hipocogenicidade do parênquima hepático e hiperecogenicidade da cortical e medular renal.

2.2 ASPECTOS RELACIONADOS A FUNÇÃO RENAL

Segundo Dyce, et al. (1990) e Ellenport (1986) os rins dos carnívoros são “retroperitoneais”, curtos, grossos e em forma de feijão. O rim direito relaciona-se medialmente à glândula adrenal direita e à veia cava caudal, lateralmente à última costela e à parede abdominal e ventralmente ao fígado e pâncreas. O rim esquerdo relaciona-se cranialmente ao baço (ou estômago, quando este está cheio), medialmente à glândula adrenal esquerda e à aorta, lateralmente à parede abdominal e ventralmente ao cólon descendente. Na cadela, os pólos caudais de ambos os rins se relacionam aos mesovários envoltos por tecido adiposo e aos ovários. O rim direito não está sujeito a muita variação em sua posição, diferente do rim esquerdo, que está frouxamente inserido pelo peritônio e cuja posição pode ser afetada pelo grau de distensão do estômago.

De modo geral, a superfície renal é levemente convexa, exceto pela existência de uma depressão na borda medial, denominada seio renal. O hilo renal abre-se neste seio, e através dele passam o ureter, os vasos sanguíneos e nervos renais. Seu parênquima é dividido em córtex e medula e é envolto por uma forte cápsula fibrosa. A medula apresenta segmentos em forma de pirâmides, cujos ápices, as papilas renais, o interior de expansões em forma de cálices. No caso do rim canino, que é unipiramidal, não há cálices, e os ápices das pirâmides, unem-se formando a crista

renal (ELLENPORT, 1986; DYCE et al., 1997; KONIG; RUBERTE; LIEBICH, 2004).

A unidade morfofuncional do rim é o néfron. Este é composto de corpúsculo renal, túbulo proximal, alça de Henle e túbulo contorcido distal.

Cada néfron drena para o interior de um ducto coletor. O córtex e a medula renal possuem túbulos renais, vasos e tecido intersticial. Nos carnívoros, todos os glomérulos estão localizados na região cortical. Na medula encontram-se porções dos túbulos proximais, túbulos distais, alças de Henle e ductos coletores. Cada ducto coletor recebe a drenagem de mais de um néfron, que se abre na extremidade de uma papila, como ducto papilar. Os ductos papilares desembocam em uma dilatação comum, chamada pelve renal, a qual representa a origem dilatada do ureter. (ELLENPORT, 1986; DYCE et al., 1990; OSBORNE; FINCO, 1995; KONIG et al., 2004;).

Os rins são responsáveis pela depuração do sangue e manutenção da homeostasia. Sua função é exercida pelos néfrons através dos mecanismos de filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular. (OSBORNE; FINCO, 1995).

O rim dos mamíferos é um órgão extremamente complexo, tanto anatomicamente, como funcionalmente, exercendo algumas funções primordiais para a manutenção da vida, com a regulação do equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido-básico. O rim apresenta também o papel importante na síntese de hormônios que interferem no mecanismo endócrino e metabólico, citando-se entre eles a eritropoetina, imprescindível na maturação dos eritrócitos. É também nos rins que ocorre a ativação de 25-diidroxicolecalciferol em 1,25-diidroxicolecalciferol. Hook e Hewitt (1986) Malnic e Marcondes (1986), relatam a participação dos rins na síntese de prostraglandinas e cininas.

Várias são as provas laboratoriais utilizadas para diagnóstico de lesões e alterações da função renal, citando-se entre elas as que indicam a ocorrência de glicosúria, proteinúria e cilindrúria e a avaliação quantitativa e qualitativa das células do epitélio renal no sedimento urinário, as quais são indicativas de lesão renal. A uréia é resultante do metabolismo protéico, é excretada pelos rins, sendo cerca de 40% reabsorvida pelos túbulos renais. Portanto os níveis de uréia sanguínea são uma indicação da função renal e servem como um índice da velocidade de filtração glomerular. A uréia sanguínea pode estar elevada na insuficiência renal, metabolismo do nitrogênio aumentado associado com diminuição do fluxo sanguíneo renal ou alteração da função renal. Os testes seriados da uréia do sangue normalmente são indicados para seguir o progresso do paciente, não ocorrendo elevação até que 70 a 75 % ou mais dos néfrons de ambos os rins se tornem afuncionais (KIRK,1987).

A creatinina é derivada da creatina e da fosfocreatina durante o metabolismo muscular sendo excretada através dos glomérulos renais, e uma pequena quantidade excretada pelos túbulos proximais. Os níveis de creatinina não são afetados pela proteína alimentar, catabolismo protéico, sexo, idade ou exercício. A dosagem da creatinina pode ser usada como medida razoável da velocidade de filtração glomerular, pois há uma relação entre o grau de filtração glomerular e a concentração da creatinina no plasma, para cada 50% da redução de filtração glomerular, a creatinina deve dobrar (KIRK, 1987).

Em relação à atividade glomerular, esta é avaliada através da dosagem da creatinina e uréia sérica, sendo este o teste mais utilizado na rotina, que estas apresentam como limitação a influência de fatores extra renais, (como estado de hidratação do paciente), além de só se apresentarem aumentadas quando já existem 50% de perda da função renal (GRANERUS, 2000).

O aumento da atividade de fosfatase alcalina na urina é considerado também um indicador precoce de lesão renal (HEIENE; BIEWENGA; KOEMAN, 1991), e pode ser usado para detectar lesões menos severas.

A mensuração da taxa de filtração glomerular (TFG) é um método para avaliar a função renal. A TFG não pode ser mensurada diretamente, mas é estimada usando testes de depuração de creatinina e outros marcadores. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas e descritas durante os últimos anos: clearance de creatinina endógena, clearance de ^{14}C -Inulina, clearance de $^{99\text{mTc}}$ -DTPA, clearance de meios de contraste iodados como Iohexol[®], clearance de ^{51}Cr -EDTA, além de técnicas cintilográficas de captação de DTPA (KRAWIEC et al., 1986; COULTER; BARSANTI, 1993; FINCO; MOE; HEIENE, 1995; BROWN et al., 1996; BARTHEEZ; DENIS; DIBARTOLA, 2000). A técnica cintilográfica tem a vantagem de ser um método rápido, não invasivo, não necessitando de amostras de sangue ou urina, porém esta técnica apresenta como desvantagem o alto custo da Gamma câmara que faz a captação da emissão de radioatividade e transforma em imagens, e no caso dos animais, a necessidade de realizar o procedimento com o animal anestesiado, uma vez que este necessita permanecer parado durante o tempo do exame e mesmo os movimentos respiratórios, quando o animal está ofegante podem atrapalhar na interpretação dos resultados. (KRAWIEC et al., 1986; DANIEL et al., 1999; BARTHEZ et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODO

Foram realizados exames de uréia e creatinina sérica, clearance de creatinina, clearance de EDTA-Cromo, em 27 cães da raça Golden Retriever afetados, portadores e não afetados pela distrofia muscular. O experimento foi realizado nas dependências do canil experimental Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD – Brasil) do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Centro de Estudo do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

3.1 ANIMAIS

Utilizou-se 27 cães da raça Golden Retriever, que foram divididos em 3 grupo de 9 animais, sendo o grupo afetado constituído por (7 machos e 2 fêmeas todos afetados com distrofia muscular), o grupo portador por (9 fêmeas portadoras de distrofia muscular) e o grupo controle por (5 machos normais e 4 fêmeas normais). Os animais do grupo afetado e portador pertencem ao Canil Experimental do Projeto Genoma Humano USP, onde o estudo foi realizado, e os do grupo controle são oriundos do canil Alternativas Dog Show e foram mantidos sobre a guarda dos proprietários.

Todos os grupos receberam o mesmo tipo de manejo alimentar, com ração Super Premium da marca Hill's®, 3 vezes ao dia e água a vontade.

A triagem dos cães normais, afetados e portadores foi feita segundo o proposto por Bartlett et al. (1996), que utilizou o teste de Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) para classificar os animais afetados, portadores e normais. Para purificação do

DNA genômico de células do cordão umbilical, utilizou-se o kit comercial GFXTM Genomic (GE Healthcare). A região contendo a mutação de ponto foi amplificada por meio da Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) utilizando o termociclador PTC-200 (MJ Research). Os pares de primers utilizados foram: GF2 (5' – CTT AAG GAA TGA TGG GCA TGG G – 3') e GR2 (5' – ATG CAT AGT TTC TCT ATC ATG C – 3') localizados, respectivamente, no intron 6 e exon 7 do gene da distrofina canino. Os amplicons gerados foram submetidos à digestão com a enzima *Sau96 I* (GE Healthcare), capaz de reconhecer o sítio mutado. Os produtos da digestão enzimática foram analisados em gel de poliacrilamida 8% e visualizados após coloração com nitrato de prata.

3.2 RADIOFÁRMACOS

Utilizamos o ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) marcado com ⁵¹Cr (⁵¹Cr-EDTA), fornecido já marcado pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo (IPEN-SP), com eficiência comprovada acima de 99% . A atividade será de 50μCi diluído em 3 ml de água destilada para injeção.

3.3 CLEARANCE DE CREATININA ENDÓGENA

O clearance de creatinina endógena, empregado para estimar a taxa de filtração glomerular, foi executado com a técnica de coleta de dois períodos subsequentes, de 20 minutos de acordo com o método descrito por Souza et al. (1995), nas próprias dependências do Canil GRMD – Brasil.

3.4 CLEARANCE DE EDTA CROMO

O clearance de EDTA foi realizado através da técnica de 2 amostras com intervalos de 2 horas e 4 horas após a aplicação do radiofármaco e os resultados da filtração glomerular foram obtidos através da utilização de uma planilha que é utilizada na rotina clínica do Centro de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5 BIOQUÍMICA SÉRICA E URINÁRIA

Foram utilizadas amostras de soro obtidas após sinérise de sangue coletado por punção da veia cefálica do antebraço, e amostras de urina coletadas por cateterização uretral. Os exames de uréia e creatinina séricas e urinárias foram realizados no laboratório de cultura celular do setor de anatomia da FMVZ-USP, no aparelho de análises Labtest[®].

3.6 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

Os cães foram divididos em três grupos, sendo grupo afetado (composto por sete cães machos e três fêmeas todos afetados pela distrofia muscular), grupo controle (composto por 5 (cinco) machos e quatro fêmeas normais) e grupo portador (composto por nove fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular). Os animais foram examinados clinicamente, sendo que em nenhum deles foi encontrado alterações que impedissem a sua utilização no experimento.

Primeiramente foram realizados os exames de clearance de creatinina e uréia e creatinina sérica, onde foi coletado uma amostra de 2 ml de sangue venoso através de venopunção da veia cefálica do antebraço direito, utilizando-se seringa de 3 ml e agulha hipodérmica 20X5,5. O sangue foi acondicionado em tubo vacutainer[®] seco e mantido sobre refrigeração, para posterior processamento. Após a coleta de sangue foi realizada a cateterização uretral dos animais com sonda uretral flexível Embramed nº8 ou nº6.

Após a cateterização foi feito o esvaziamento total da vesícula urinária (confirmada por ultrassonografia realizada com o aparelho GE Medical Systems LOGIQ[™] 100 PRO) e em seguida foi injetado pela sonda 5 ml de água ultrapura, marcando-se a hora. Vinte minutos após a injeção da água ultrapura foi realizado novo esvaziamento total da vesícula urinária e foi coletada uma alíquota da urina retirada e anotado o volume total retirado, injetando-se novamente 5ml de água ultrapura. Depois de vinte minutos foi realizado um novo esvaziamento da vesícula urinária, separando-se nova alíquota e anotando-se o volume total da coleta, as alíquotas separadas foram destinadas a dosagem de creatinina na urina.

O clearance de EDTA cromo foi realizado através da administração, por via endovenosa, do radiofármaco nos cães, utilizando-se a veia cefálica do antebraço direito, previamente cateterizada com cateter BD insyte[®] nº 22G. Foram coletadas duas amostras de 15 mL de sangue, através de venopunção da veia cefálica do antebraço esquerdo, utilizando-se seringa de 20 ml e agulha 20X5,5 BD (após 2 horas e 4 horas da injeção). O sangue foi dessorado e no soro foi feita a contagem de atividade radioativa no contador automático **Perkin Elmen Precisely 1480 Automatic Gamma Counter Wizard[™] 3^o**, para se calcular o clearance de ⁵¹Cr

EDTA, através da utilização de uma tabela utilizada na rotina da Clínica de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para cada um dos cães foram avaliadas as seguintes variáveis: Volume de Urina A (ml/min), Ucr A (mg/ml), Volume de Urina B (ml/min), Ucr B (mg/ml), Ccr solução A (ml/min), Ccr solução B (ml/min), Média (ml/min) entre Ccr solução A e Ccr solução B, Ccr solução A (ml/kg/min), Ccr solução B (ml/kg/min), Média (ml/kg/min) entre Ccr solução A e Ccr solução B, Uréia (mg/dl) e Creatinina (mg/dl).

3.7.1 MÉTODO

Para cada uma das variáveis estudadas foi realizado um experimento balanceado com um fator (situação do cão) de três níveis (afetado, controle e portador), ou seja:

$$y_{ij} = \mu + \text{situação}_i + e_{ij}$$

com $i = 1, 2, 3$ (afetado, controle e portador) e $j = 1, 2, \dots, 9$ (cada um dos 9 cães em cada grupo).

y_{ij} representa o j -ésimo cão do i -ésimo grupo, μ representa a média geral, situação_i representa o efeito do grupo i e e_{ij} a componente aleatória do erro.

Supondo que $e_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ independentes então $y_{ij} \sim N(\mu + \text{situação}_i, \sigma^2)$.

3.7.1.2 HIPÓTESE DE IGUALDADE ENTRE OS GRUPOS

$$H_0: \text{situação}_1 = \text{situação}_2 = \text{situação}_3$$

$$H_1: \text{situação}_1 \neq \text{situação}_2, \text{ ou } \text{situação}_1 \neq \text{situação}_3, \text{ ou } \text{situação}_2 \neq \text{situação}_3, \text{ ou } \text{situação}_1 \neq \text{situação}_2 \neq \text{situação}_3$$

3.7.1.3 ANÁLISE DE VARIANCIA (ANOVA)

A variabilidade total do experimento é representada por

$$SQT = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^9 (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2$$

A SQT pode ser decomposta em

$$SQGrupo = 9 * \sum_{i=1}^3 (\bar{y}_i - \bar{y}_{..})^2 \text{ e } SQE = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^9 (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

Pelo teorema de Cochran temos que $(SQGrupo / \sigma^2) \sim \text{Quiquadrado}_{(3-1)}$ e $(SQE / \sigma^2) \sim \text{Quiquadrado}_{(3(9-1))}$. Então sob H_0 ($\text{situação}_1 = \text{situação}_2 = \text{situação}_3$) temos que

$$F = \frac{[SQGrupo / (3 - 1)]}{[SQE / (3 * (9 - 1))]}$$

Quanto mais próximo F for de 1 mais evidências temos para não rejeitar H_0 , ou seja, mais evidências temos de que não há diferença entre os grupos em relação à variável estudada. Porém se F for muito maior que 1 temos evidências de há diferença entre, pelos menos, dois dos grupos estudados em relação à variável resposta.

O nível de significância considerado nas análises foi de 5%, portanto se o valor de F for maior que 3,40 (ou p-valor menor que 0,05) teremos evidências para rejeitar a hipótese nula (H_0).

Quando H_0 foi rejeitada, usou-se o teste de médias de Tukey com o objetivo de verificar quais grupos diferiram entre si. Este teste consiste em comparar as médias de cada grupo, duas a duas, utilizando o módulo da diferença entre a média dos 9 cães de um grupo e a média dos 9 cães de outro grupo e comparando com um valor tabelado. Se o módulo da diferença for maior que o valor tabelado então há evidência de que há diferença entre os dois grupos comparados.

O programa estatístico usado nas análises foi o MINITAB 14.2 processado em ambiente Windows®.

4 RESULTADOS

Foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos de cães para o parâmetro Vol. Urina A (p -valor = 0,021) (Tabela 1 e Figura 1) O grupo Afetados obteve média significativamente superior à do grupo Portador, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Controle e Portador e Controle e Afetado.

Tabela 1 – Médias com desvio padrão do volume de urina na solução A, em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Vol. urina A (ml/min)	Afetado	0,70	0,30	0,21	0,67	1,25
	Controle	0,60	0,16	0,45	0,59	1,00
	Portador	0,42	0,08	0,32	0,41	0,55

Figura 1 – Média com desvio padrão do volume de urina na solução A em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo 2007

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os três grupos de cães para os parâmetros Vol. Urina B (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 2 – Médias com desvio padrão do volume de urina na solução B em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Vol. Urina B (ml/min)	Afetado	0,54	0,16	0,35	0,52	0,85
	Normal	0,65	0,26	0,38	0,55	1,12
	Portador	0,66	0,23	0,40	0,59	1,05

Figura 2 - Média com desvio padrão do volume de urina na solução B em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo 2007

Foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos de cães para o parâmetro concentração de creatinina na urina da solução A (Ucr A) (p-valor = 0,009) (Tabela 3 e Figura 3). O grupo Afetados obteve média significativamente inferior às dos grupos Portador e Controle, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Controle e Portador.

Tabela 3 – Média com desvio padrão da concentração de creatinina na urina da solução A em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Ucr A (mg/ml)	Afetado	1,12	0,33	0,89	1,02	1,96
	Controle	1,41	0,22	1,14	1,37	1,80
	Portador	1,52	0,21	1,24	1,49	1,88

Figura 3 - Média com desvio padrão da concentração de creatinina na urina da solução A em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos Afetado, Controle e Portador, para o parâmetro concentração de creatinina na urina da solução B Ucr B (mg/ml), (Tabela 4 e Figura 4)

Tabela 4 – Média com desvio padrão da concentração de creatinina na urina da solução B em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Ucr B (mg/ml)	Afetado	1,10	0,30	0,80	0,98	1,77
	Controle	1,34	0,25	1,06	1,29	1,80
	Portador	1,28	0,22	0,99	1,29	1,58

Figura 4 - Média com desvio padrão da concentração de creatinina na urina da solução B em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os três grupos de cães para os parâmetros clearance de creatinina na solução A (Ccr A) em ml/min. (Tabela 5 e Figura 5).

Tabela 5 – Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A (ml/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Ccr sol. A (ml/min)	Afetado	78,61	21,79	52,14	79,00	115,91
	Controle	91,50	32,50	57,40	77,60	142,50
	Portador	64,88	15,63	47,50	63,56	95,63

Figura 5 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução A (ml/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os três grupos de cães para os parâmetros clearance de creatinina na solução B (Ccr B) em ml/min. (Tabela 6 e Figura 6).

Tabela 6 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução B (ml/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Ccr sol. B (ml/min)	Afetado	62,37	13,66	42,55	62,34	88,29
	Controle	93,80	47,10	54,50	75,90	205,80
	Portador	82,06	19,05	56,00	78,55	118,35

Figura 6 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução B (ml/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os três grupos de cães para o parâmetro média do clearance de creatinina na solução A e clearance de creatinina na solução B em (ml/min). (Tabela 7 e Figura 7).

Tabela 7 – Média clearance de creatinina solução A e clearance de creatinina solução B (ml/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Média (Ccr A e Ccr B – ml/min)	Afetado	70,49	11,67	50,69	74,07	84,90
	Controle	92,70	36,00	58,10	78,10	169,60
	Portador	73,47	14,23	51,75	72,82	97,38

Figura 7 - Média clearance de creatinina solução A e clearance de creatinina solução B (ml/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos de cães para o parâmetro Ccr da solução A (ml/kg/min) (p-valor = 0,002) (Tabela 8 e Figura 8). O grupo Afetado obteve média significativamente superior às dos grupos Portador e Controle, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Controle e Portador.

Tabela 8 – Média com desvio padrão clearance de creatinina solução A (ml/kg/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Ccr da solução A (ml/kg/min)	Afetado	4,12	1,01	2,06	4,06	5,25
	Controle	3,04	0,75	2,06	3,19	4,19
	Portador	2,62	0,55	1,80	2,48	3,37

Figura 8 - Média com desvio padrão clearance de creatinina solução A (ml/kg/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os três grupos de cães para o parâmetro clearance de creatinina na solução B (Ccr B) (ml/kg/min) (Tabela 9 e Figura 9).

Tabela 9 – Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução B (ml/kg/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Ccr da solução B (ml/kg/min)	Afetado	3,25	0,52	2,34	3,12	3,88
	Normal	3,05	0,99	2,04	2,84	5,28
	Portador	3,37	0,98	2,46	3,01	5,19

Figura 9 - Média com desvio padrão do clearance de creatinina na solução B (ml/kg/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos de cães para o parâmetro Média do clearance de creatinina na solução A (Ccr A) e do clearance de creatinina da solução B (Ccr B) (ml/kg/min) (p-valor = 0,009). O grupo Afetado obteve média significativamente superior às dos grupos Portador e Controle, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Controle e Portador (Tabela 10 e Figura 10)

Tabela 10 – Média com desvio padrão dos clearance de creatinina solução A e clearance de creatinina solução B (ml/kg/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Média (Ccr A e Ccr B – ml/kg/min)	Afetado	3,82	0,23	3,37	3,79	4,16
	Normal	3,04	0,71	2,05	3,05	4,35
	Portador	3,00	0,66	2,23	2,92	4,27

Figura 10 - Média com desvio padrão dos clearance de creatinina solução A e clearance de creatinina solução B (ml/kg/min) em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos de cães para o parâmetro clearance de EDTA-Cromo ($p\text{-valor} < 0,001$) (Tabela 11 e figura 11). O grupo dos afetados apresentou média significativamente maior que o grupo Controle e Portadores. O grupo Controle apresentou média significativamente maior que o grupo Portador.

Tabela 11 – Média e desvio padrão do clearance de EDTA-Cromo em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Afetado	5,21	1,00	4,00	4,90	6,80
Controle	3,54	0,74	2,20	3,60	4,40
Portador	2,47	0,28	2,10	2,40	2,90

Figura 11 – Clearance de EDTA Cromo em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos de cães para o parâmetro Uréia (p -valor = 0,009) (Tabela 12 e figura 12). O grupo controle apresentou média significativamente inferior ao grupo Afetado. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos: Afetado e Portador.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à creatinina (Tabela 13 e Figura 13).

Tabela 12 – Média e desvio padrão da dosagem de uréia sérica em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Uréia	Normal	31,44	4,98	22,00	32,00	40,00
	Afetado	38,00	3,08	33,00	38,00	42,00
	Portador	35,33	4,00	30,00	35,00	41,00

Figura 12 – Média e desvio padrão da dosagem de uréia sérica em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Tabela 13 – Média e desvio padrão da dosagem de creatinina sérica em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Parâmetro	Situação	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Creatinina	Afetado	0,93	0,17	0,70	0,94	1,20
	Controle	0,96	0,18	0,60	1,01	1,12
	Portador	0,99	0,13	0,80	1,00	1,20

Figura 13 – Média e desvio padrão da dosagem de creatinina sérica em cães Golden Retrievers (GRMD) dos grupos: Afetado, Controle e Portador, São Paulo, 2007

Quadro 1 – Fórmulas matemáticas representando os resultados obtidos

Volume de urina A	$A > C > P$
Volume de urina B	$A < (C \approx P)$
Ucr A	$P > C > A$
Ucr B	$C > P > A$
Ccr Sol. A (ml/min)	$C > A > P$
Ccr sol. B (ml/min)	$C > P > A$
Média (Ccr A e CcrB) (ml/min)	$C > (P \approx A)$
Ccr sol. A (ml/min/Kg)	$A > (C \approx P)$
Ccr sol. B (ml/min/Kg)	$A \approx C \approx P$
Média (CcrA e CcrB) ml/min/Kg)	$A > (C \approx P)$
EDTA – Cromo	$A > C > P$
Uréia sérica	$A > P > C$
Creatinina sérica	$P > C > A$

5. DISCUSSÃO

A insuficiência renal primária pode ser causada por várias doenças que acarretam o não funcionamento de pelo menos três quartos dos néfrons de ambos os rins, quando não há a compensação através de sua hipertrofia de um dos rins. (OSBORNE; FINCO, 1995).

Apesar dos grandes avanços na técnica diagnóstica das doenças renais na Clínica Veterinária de Pequenos Animais, os indicadores brutos da função glomerular, creatinina e uréia sérica, continuam sendo os parâmetros mais utilizados para avaliação da função glomerular, apesar de todas as suas limitações, uma vez que só são encontradas alterações nas concentrações plasmáticas quando já existem mais de 50% de néfrons afuncionais (GRANERUS, 2000; BIWENGA; VAN DEN BRON, 1981). Isto pode retardar ou mesmo impedir um diagnóstico correto, prejudicando significativamente o plano terapêutico e o prognóstico (BROWN, 1996).

O clearance de creatinina é uma técnica de diagnóstico com maior precisão e eficiência para os casos de disfunção glomerular e, portanto, da insuficiência renal. (Souza, 2002).

Optou-se neste estudo, em realizar também o clearance de creatinina e o clearance de EDTA-Cromo, com o intuito de realizar o diagnóstico precoce de alterações da filtração glomerular.

O clearance de creatinina foi realizado pelo método de duas amostras subsequentes de 20 minutos, como descrito por (SOUZA et al., 1995), uma vez que a técnica de clearance de creatinina em 24 horas é mais complexa e exige a utilização de gaiolas metabólicas.

O clearance de creatinina foi calculado através da fórmula:

$$\frac{(\text{Ucr}) \text{ creatinina urinária (MG/dL)} \times \text{volume de urina (ml)}}{(\text{Pcr}) \text{ Creatina sérica (mg/dL)} \times \text{tempo (min.)} \times \text{peso (kg)}}$$

Sendo assim foram avaliados o volume de urina produzido, a concentração de creatinina nas amostras de urina, a creatinina sérica, o tempo entre as coletas e o peso dos animais, na expectativa de se obter a taxa de filtração glomerular.

Foram encontradas diferenças entre os três grupos para o parâmetro volume de urina na solução “A” (p-valor = 0,021), sendo que o grupo dos afetados obteve média significativamente superior que os demais grupos **A>C>P**.

Já para o parâmetro concentração de creatinina na solução “A” (p-valor = 0,009), o grupo dos afetados obteve média significativamente inferior ao demais grupos **P>C>A**.

Possivelmente estas diferenças encontradas no grupo dos afetados tenham ocorridos em decorrência de uma maior diurese apresentada, uma vez que estes animais apresentam grande dificuldade em manter a homeostase hídrica. Esta maior diurese acaba levando a uma menor capacidade de concentração da urina. As quantidades de substâncias ou elementos figurados presentes em amostras de urina dependem não só de fatores intrínsecos aos processos de excreção e secreção, mas também do fator concentração da urina (OSBORNE; FINCO, 1995; McCAW et al., 1989; PORTELLA, 2004).

O grupo dos afetados também apresentou alterações em relação ao parâmetro clearance de creatinina na solução “A” (p-valor = 0,002), tendo apresentado média significativamente superior à dos grupos portador e controle, sendo que entre os grupos portador e controle não houve diferenças significativas **A > (N ≈ P)**.

Levando-se em consideração a fórmula anteriormente citada, podemos deduzir que o aumento no clearance de creatinina ocorreu em decorrência dos animais do grupo afetados apresentarem média de peso menor do que dos outros dois grupos. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Souza (2002), que realizou exames similares em cães Golden Retrievers não portadores, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva, e não diferem dos valores de referências.

O grupo dos afetados também apresentou média significativamente superior aos demais grupos quanto a média do clearance de creatinina na solução “A” e média de clearance de creatinina na solução “B” em (ml/kg/min.) (p-valor 0,009), sendo que os demais grupos não apresentaram diferenças significativas $A > (N \approx P)$.

Esta superioridade demonstrada pelo grupo dos afetados se deve ao fato que este grupo apresentou também parâmetros de volume de urina na solução “A” e clearance de creatinina na solução “A” maior, tendo isto influenciado no resultado dos valores das médias do clearance de creatinina na solução “A” e média de clearance de creatinina na solução “B” em (ml/kg/min.).

Os resultados encontrados para o clearance de creatinina dos três grupos são semelhantes aos encontrados por Carneiro (2002) e Souza (2002).

O clearance de rádio nuclídeos é uma técnica não invasiva, simples, segura e exata (PADHY, 2004). Optou-se pela utilização do Clearance de EDTA-Cromo, utilizando-se o método de duas amostras com intervalos de 120 e 240 minutos após a administração do radiofármaco, seguindo o protocolo seguido pela Clínica do Centro de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os cálculos do clearance foram obtidos através da utilização da planilha que é utilizada na rotina da clínica. (Apêndice A).

O grupo dos afetados apresentou média significativamente maior que os demais grupos para o parâmetro clearance de EDTA-Cromo ($p\text{-valor} < 0,001$). O grupo controle apresentou média significativamente maior que o grupo dos portadores $A > N > P$. Este resultado é compatível com os resultados encontrados para o clearance de creatinina, aonde o grupo afetado obteve média significativamente superior aos demais grupos, mostrando uma maior filtração glomerular. Mesmo com essas diferenças entre todos os grupos, os animais apresentam-se dentro dos valores de referencia descritos por (BIEWENGA; VAN DEN BRON, 1981). No entanto, apesar desta técnica ser empregada com frequência na medicina humana para avaliação da filtração glomerular, na literatura não existem outros relatos da utilização desta técnica em cães Golden Retrievers com distrofia muscular.

Quanto ao parâmetro uréia ($p\text{-valor} = 0,009$), o grupo controle apresentou média significativamente inferior aos demais grupos, sendo que não houveram diferenças estatísticas entre os grupos afetado e portador ($A \approx P$) $> N$. Este fato pode ser explicado uma vez que a uréia não é considerada por vários autores como um marcador ideal da função renal, uma vez que pode sofrer influências por diversos fatores como alimentação, degradação muscular e é sabido que os animais afetados pela distrofia muscular progressiva apresentam grande degradação muscular. (COLLINS; MORGAN, 2003; SHELTON; ENGVALL, 2004).

Para o parâmetro creatinina não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os três grupos, a média do grupo portador foi igual a do grupo não portador e afetado $P \approx N \approx A$. (FINCO; COULTER; BARSANTI, 2000, GUYTON et al.1997).

Os resultados encontrados para o clearance de creatinina e creatinina sérica são muito similares aos encontrados por Souza, (2002).

Apesar das alterações estatísticas encontradas dentro dos grupos para alguns fatores como anteriormente descrito, todos os animais apresentaram-se dentro dos limites de normalidade dos parâmetros pesquisados, não tendo sido detectados sinais clínicos ou laboratoriais que possam confirmar existência de alterações renais nos cães GRMD. No entanto também não ficou descartada a possibilidade da existência de alterações subclínicas na função renal, uma vez que no grupo afetado, mesmo os animais sendo visivelmente desidratados em decorrência da dificuldade de deglutição e outras alterações causadas pela distrofia, os animais apresentaram produção urinária e clearance de creatinina superiores aos dos demais grupos, quando em condições renais fisiológicas, a produção de urina deve diminuir se houver desidratação (FINCO, 1995), isto pode sugerir que estejam ocorrendo alterações renais que não foram detectadas pelos exames realizados, talvez a realização de biópsia renal ou mesmo o exame histológico dos rins desses animais possam trazer mais informações sobre a existência ou não de doença renal nos GRMD.

Outro fato a ser considerado é que a média de idade dos animais do grupo afetado varia entre 8 meses e 4 anos, e é sabido que descartando-se as alterações congênicas que acometem animais jovens, as demais doenças renais tem maior prevalência em animais com idade superior aos 7 anos (FINCO, 1995).

Através dos testes realizados não foi possível comprovar uma lesão glomerular mais evidente, porém também não é possível afirmar que não existam lesões glomerulares, entretanto as diferenças existentes podem sinalizar ao clínico a necessidade de se redobrar a atenção.

Durante o estudo, podemos perceber que o grau de dificuldade de realização das técnicas utilizadas, foi diferente, sendo que o clearance de creatinina apesar de ser uma técnica de baixo custo, é trabalhoso, exigindo a utilização de cateterização vesical, e

também é sujeita a falhas, uma vez que existe a necessidade de esvaziar todo o conteúdo vesical.

Estes fatos dificultam ainda a utilização desta técnica na rotina de clínicas e hospitais veterinários.

O clearance de EDTA-Cromo mostrou ser uma técnica relativamente fácil de realização, porém de alto custo, uma vez que a dose da medicação é relativamente cara. Existe a necessidade de equipamentos para a realização da leitura de radiação nas amostras de soro, que também é de alto custo, além disso, há necessidade de um conjunto de medidas especiais para a utilização de medicamentos radioativos. Estes fatores tornam a utilização desta técnica restrita à pesquisa, pelo menos até o momento.

6. CONCLUSÕES

Analisando-se os resultados obtidos neste estudo, chegou-se as seguintes conclusões sobre a função renal dos cães com Distrofia Muscular do Golden Retriever:

1. Os animais afetados e portadores de distrofia muscular do Golden Retriever GRMD, estudados, não apresentaram alterações da função glomerular segundo as provas realizadas, tendo apresentado todos os resultados dentro dos limites de normalidades para a espécie.
2. Apesar das alterações sofridas pelos animais afetados com a distrofia muscular progressiva, a função glomerular mostrou-se preservada até o momento.
3. Os exames laboratoriais utilizados não foram suficientes para o diagnóstico precoce de lesões renais em cães Golden Retrievers com distrofia muscular (GRMD), entretanto podem sinalizar ao clínico, conjuntos de procedimentos que podem melhorar a condição e a sobrevida dos animais afetados.

REFERÊNCIAS

ABDIM Associação Brasileira de Distrofia Muscular. **Doenças Neuromusculares**, 2003. Disponível em: < [HTTP://www.adbim.org.br/neuro.htm](http://www.adbim.org.br/neuro.htm) > Acesso em 10/08/2005

BAROHN, R. J.; LEVINE, E. J.; OLSEN, J. O.; MENDELL, J. R. Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. **New England Journal Medicine**, 1988.

BARTHEZ, P. Y.; DENNIS, C. J.; DIBARTOLA, S. P. Effect of sample number and time on determination of plasma clearance of technetium Tc 99m pentetate and orthiodohippurate sódium I 131 in dogs and cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 280-285, 2000.

BARTLETT, R. J. et al. *In vivo* Targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric rna/dna oligonucleotide. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 615-22, 2000.

BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LUI, L.A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Labrador retriever. **Journal of American Hospital Association**, v. 38, n° 3, p. 255-261, 2002.

BERRY, C. R.; GASCHEN, F. P.; ACKERMAN, N. Radiographic and ultrasonographic features of hypertrophic feline muscular dystrophy in two cats. **Veterinary Radiology & Ultrassound**, v. 33, n. 6, p. 357 – 364, 1992.

BIBLIOMED INC. **Distrofia muscular de Duchenne**. Disponível 2004, em : <[htt://www.espacorealmedico.com.br](http://www.espacorealmedico.com.br)> Acesso em: 11 jun. 2006.

BIEWENGA, W. J.; VAN DEN BRON W. E.; Assessment of glomerular filtration rate in dogs with renal insufficiency: analyses of the ⁵¹Cr-EDTA clearance and its relation to the plasma concentrations of urea and creatinine; **Research in Veterinary Science**, v. 30, p. 158-160, 1981.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K. J.; KRAG, T. O. B.; KHURANA, T. S.; Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal of Molecular Medicine**, v. 82, n. 2, p. 81-87, 2004.

BRAZEAU, G. A.; MATHEW, M.; ENTRIKIN, R. K. Serum and organ indices of the mdx dystrophy mouse. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, 77, n. 2, p. 179 – 189, 1982.

BROWN, S. A.; FINCO, D. R.; BOUDINOT, F. D.; WRIGT, J.; TAVER, S. L.; COOPER, T. Evaluation of a single injectio method, using iohexol, for estimating glomerular fitration rate in cats and dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 105-110, 1996.

CARNEIRO, R. S. Contribuição ao estudo do *clearance* de creatinina e da excreção fracionada de sódio, potássio e uréia e determinação de valores de referência de indicadores de função renal em cães. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, p. 86, 2002.

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

COLLINS, C. A.; MORGAM, J. E. Duchenne's Muscular Dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International journal of experimental pathology**, v. 84, p. 165–172, 2003.

DANIEL, G. B.; MITCHELL, S. K.; MAWBY, D.; SACKMAN, J. E. & SCHIMIDT, D. Renal nuclear medicine: a review. **Veterinary Radiology & ultrasound**, v. 40, p. 572-587, 1999.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O aparelho urogenital. In: **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 110 – 139. 1997

ELLEMPORT, C. R. Aparelho urogenital. In: GETTY, R. **Sisson/Grossman – anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1986, p. 1445–1465.

EMERY, A. E. H. Treatment. In: Muscular dystrophy – **The facts**. New York: Oxford University Press Inc., 1994 p. 39–61.

ENGEL, A. G. Doenças musculares (miopatias) e da junção neuromuscular. In: WYNGAARDEN, J. B.; SMITH JR., L. H. **CECIL – Tratado de medicina interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 1988–2001.

ERRINGTON, S. J.; FLETCHER, S.; MANN, C. J.; WILTON, S. D. Multiple exon skipping in the dystrophin gene: a more effective therapy? **Neuromuscular Disorders**, v. 13, n. 7–8, p. 615 – 668, 2003.

FAWDRY, R. M ; GRUENEWALD, S. M; COLLINS, L. T; ROBERTS, D. J. Comparative assessment of techniques for estimation of glomerular filtration rate with 99m Tc-DTPA. **European Nuclear Medicine**, n 11: 7–12, 1985

FINCO, D. R.; COULTER, D. B.; BARSANTI, J. A. Endogenous creatinine clearance measurement of glomerular filtration rate in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1575-1578, 1995.

GLEADHILL, A; PETER, A. M; MICHELL, A. R. A simple method for measuring glomerular filtration rate in dogs. **Research Veterinary Science**, n. 59 p. 118 – 123, 1995.

GRANERUS, G. Njurarna och ovre urinvagarna. **Sweden**: Studentlitteratur, lund. 2000.

GUYTON, A. C; HALL, J. E; Tratado de fisiologia médica, 9º ed. p. 296, 1997

HEIENE, R.; BIEWENGA, W. J.; KOEMAN, J. P. Urinary alkaline phosphatase and γ -glutamyl transferase as indicators of acute renal damage in dogs. **Journal os Small Animal Prattice**, v. 32, p. 521-524, 1991.

HOOGERWAARD, E. M.; BAKKER, E.; IPPEL, P. F.; OOSTERWIJK, J. C.; MAJOOR KRAKAUER, D. F.; LESCHOT, N. J.; VAN-ESSEN, A. J.; BRUNNER, H. G.; VAN-DER-WOUW, P. A.; WILDE, A.; DE-VISSER, M. Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in the Netherlands: A cohort study. **Lancet**, n. 19, p. 353, 1999.

HOOK, J. B.; HEWITT, W. R. Toxiresponses of the kidney. In: **Casarett and Doull's toxicology**. 3^a ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1986.

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.

KÖNIG, H. E.; RUBERTE, J.; LIEBICH, H. G. Aparelho urogenital. In: **Anatomia dos animais domésticos – Órgãos e sistemas**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 15-79.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILRES, M. K.; CUNDIFF, D. D.; PETROSKI, G. F.; SCHUELER, R. O. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with Golden Retriever muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 11, p. 161-173, 1988.

KRAWIEC, D. R.; BADERTSCHER II, R. R.; TWARDOCK, A. R.; RUBIN, S. I.; GELBERG, H. B. Evaluation of 99m TC- diethylenetriaminepentaacetic acid nuclear imaging for quantitative determination of the glomerular filtration rate of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 2175-2179, 1986.

LIU, J. M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; KORNEGAY, J. N. Effects of prednisone in canine muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 30, p. 767-773, 2004.

MALNIC, G.; MARCONDES, M. **Fisiologia renal**. 3^o ed. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária LTDA, 1986.

MCKERRELL, R. E. Miopatias caninas e felinas. In DUNN, J. K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 255 - 271.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Veterinary laboratory medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. P. 27–120.

MIYATAKE, M.; MIIKE, T.; ZHAO, J.; YOSHIOKA, K.; UCHINO, M.; USUKU, G. Possible systemic smooth muscle layer dysfunction due to a deficiency of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Neurology Science**, v. 93 n.1, p. 11-17. 1989.

MOE, L.; HEIENE, R. Estimation of glomerular filtration rate in dogs with 99m Tc-DTPA and iothexol. **Research in Veterinary Science**, v. 58, p. 138-143, 1995.

MORIUCHI, T.; KAGAWA, N.; MUKOYAMA, M.; HIZAWA, K. Autopsy analyses of the muscular dystrophies. **Takushima Journal Experimental Medicine**. 1991.

MUSCATELLI, F.; STROM, T. M.; WALKER, A. P.; ZANARIA, E.; RECAN, D.; MEIDL, A.; BARDONI, B.; GUIOLI, S.; ZEHETNER, G.; RABL, W. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hipoplasia congenital and hypogonadotropic hypogonadism. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 672–676, 1994.

McCAW, D.L.; FLEMING, E.J.; MINICIUK, M.G. Interpreting the results of urinalysis: A key to diagnosing renal disorders. **Veterinary Medicine**. p. 261 – 6, 1989.

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

NICHOLS, P. L.; LYMN, R. W.; DRISCOLL, P. P.; CLEARFIELD, C. Gene therapy in Duchenne muscular dystrophy. **Nih Guide**. v. 23, 1994.

NOWAK, K. J.; DAVIES, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. **Journal List – EMBO Reports**, v. 5, n. 9, p. 872–876. 2004.

OSBORNE , C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nefrology and urology**. Media: Williams & Wilkins, 1995. 960 p.

PADHY, A. K. Medición de La función renal por técnicas de aclariamento de radionuclidos. **Alasbimn Journal**, n 6, p. 23, 2004

PILLERS, D. A.; WELEBER, R. G.; POWELL, B. R.; HANNA, C. E.; MAGENIS, R. E.; BUIST, N. R. Aland Island eye disease (Forsius-Eriksson ocular albinism) and an Xp21 deletion in patient with Duchenne muscular dystrophy, glycerol kinase deficiency, and congenital adrenal hipoplasia. **American Journal of Medical Genetics**, v. 36, n. 1, p. 23 -28, 1990.

PORTELLA, V.G. Influências de métodos de coleta de urina e de técnicas clínico-laboratoriais sobre os resultados da urinálise e provas de função renal de cães. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, p. 86, 2004.

SAMIEI, H. V. Genetic surgery for muscular dystrophy in goldem retrievers. **Genome news network**, June, 2000. Disponível em:
<http://www.genomenewsnetwork.org/articles/06_00/muscular_dystrophy.shtml>
Acesso em: 2007.

SHELTON, G. D.; LIU, L. A.; GUO, L. T.; SMITH, G. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; THOMAS, W. B.; SMITH, M. O.; KLINE, K. L.; MARCH, P. A.; FLEGEL, T.; ENGVALL, E. Muscular dystrophy in female dogs. **Journal Veterinary internal Medicine**, v. 15, n. 3, p. 240-244, 2001.

SHELTON, G. D. e ENGVALL, E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. **Neuromuscular Disorders**. v. 15, p. 127–38, 2005.

SOUZA, P., Efeitos do rofecoxibe sobre a área sobre a função renal e a homeostase de água e sódio de cães com glomerulopatias crônicas, submetidos a anestesia com seoflurano, **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, p. 20, 2002.

VAINZOF, M.; YAMAMOTO, L. U.; KOSSUGUE, P. M.; FOGAÇA, L. L. Q.; VELLOSO, F. Z.; AYUB, D.; MUNIZ, V. P.; ZATZ, M.; SILVA, H. C. A.; MASSIRONI, S. M. G.; MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MIYAZATO, L. G.; MORAES, J. R. E.; DÁNGELES, F. H. F.; LACERDA NETO, J. C.; MORTARI, A. C.; BORJES, A. S.; REZENDE, L. A. L.; RAHAL, S. C. Animal models of neuromuscular disorders. **Revista Neurociências**, v. 13, n. 3, 2005.

ZATZ, M.; PASSO BUENO, M.R. Miopatias hereditárias: Avanços dos últimos dois anos. In: NITRINI, R.; MACHADO, L. R.; YACUBIAN, E. M. T.; RABELLO, G. D. **Condutas em neurologia**. São Paulo: Clínica neurológica HC\FM USP, 1995. P. 71–78.

Apêndice A – contador automático **Perkin Elmer Precisely 1480 Automatic Gamma Counter Wizard™3**” (utilizado para realizar a contagem de atividade radioativa nas amostras de sangue).

Apêndice B - Contador automático Perkin Elmer Precisely 1480 Automatic Gamma Counter Wizard™ 3” .

Apêndice C – Amostras de sangue sendo analisadas pelo contador automático.

Apêndice D – Animal afetado pela distrofia muscular progressiva.

Apêndice E – Animal afetado pela distrofia muscular progressiva em fase terminal.

Apêndice F – Animal afetado pela distrofia progressiva em plataforma utilizada para alimentação.

CENTRO DE MEDICINA NUCLEAR
HCFMUSP

NOME: **Hércules**

data 9-mar-07
IDADE (anos) 0 anos
ALTURA 0 cm
(centímetros)
PESO (quilos) 13,5 kg
Superfície corpórea = 0,00 m2

TÉCNICA DE 2 a 4 AMOSTRAS

$k \text{ (min}^{-1}\text{)} = 0,011093$

$T_{1/2} \text{ (min)} = 62$

tempo	contagens	ajuste
0	988	988
120	261	261
240	69	69

85,7 ml/min
6,3 ml/min kg

RESULTADOS

Volume de Distribuição 7727,795314 mL
RFG sem correção 85,7 mL/min
RFG p/ 1,73 m2 de SC #DIV/0! mL/min/1,73m2

Controle qualidade

$R^2 \text{ esperado} > 0,99247$

'vol. Distr > 40% do peso' 57,2%
desvio padrão (se feito em duplicata):
padrão < 2 desvio padrão
120 < 2 desvio padrão
240 < 2 desvio padrão
" 1 amostra
" 1 amostra

Apêndice G – Tabela com a curva de decaimento da atividade plasmática de EDTA, expressando o valor do clearance de EDTA-Cr.

Reg X-Clinic		
NOME	Hércules	Winner
data	39150	39150
IDADE		
ALTURA		
PESO	13,5	15,6
Volume de Distribuição	7727,79531401113	9218,99242147325
RFG sem correção	85,7230683730513	96,6720280493017
RFG p/ 1,73 m2 de SC	#DIV/0!	#DIV/0!
RFG c/ correção Chantler*		
RFG c/ correção p /1,73 m2		
RFG c/ corr Brochmer p/ 1,73m2		
RFG c/ corr Brochmer sem corrção SC		
K (const clareamento)	0,0110928233590282	0,0104861815293534
T1//2 = 0,693/k	62,4728238763474	66,0869734192683
Relação dose injetada/padrão	0,983616756532559	1,0519493985898
volume de diluição padrão	1000	1000
intervalo amostra 1 (min)	120	120
intervalo amostra 2 (min)	240	240
intervalo amostra 3 (min)		
cpm / mL amostra 1 (-BG)		
cpm / mL amostra 2 (-BG)		
cpm / mL padrão (-BG)		
cpm / ml amostra 3 (-BG)		
cpm / ml amostra 4 (-BG)*		
Comentários		
*intervalo amostra 4		
Groth (ml/min)	#REF!	#REF!
Groth (ml/min/1,73m2)	#REF!	#REF!
Ham (ml/min)	#REF!	#REF!
Ham (ml/min/1,73m2)	#REF!	#REF!
cpm / mL amostra 1 (-BG)		
cpm / mL amostra 2 (-BG)		
cpm / mL padrão (-BG)		
cpm / ml amostra 3 (-BG)		
cpm / ml amostra 4 (-BG)*		
BG		
vol Amostra 1	2	2
vol Amostra 2	2	2
vol padrão	2	2

Apêndice H – Planilha do Excel, com os resultados do Clearance de EDTA Cr

RITMO DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

Preparo:

Recomendada hidratação 5 – 6 mL/kg antes do estudo (porém não interfere muito)

Evitar ingestão de proteínas (carne vermelha) durante ou imediatamente antes do estudo, pois pode aumentar RFG

Evitar fazer em casos de ascite ou terceiro espaço (ocorre superestimativa do RFG por extravasamento lento do RF, teria que fazer coleta de urina)

Radiofármaco = EDTA-cromo-51, mínimo 30 uCi e máximo 100 uCi (2 uCi/kg). Opção: 5uCi/kg 99mTc-DTPA, com controle de ligação à proteína

Dose recomendada para este paciente = 30 uCi

Separar 2 seringas com 100 uCi de EDTA-Cr51 (seringa PACIENTE e seringa PADRÃO)

Usar agulha calibre 19 ou GELCO! Lavar com 10 mL e não lavar seringa!

Pesar a seringa PACIENTE antes e após a injeção no paciente

Quanto foi injetado (PESO seringa cheia - vazia) ?

Pesar a seringa PADRÃO antes e após injetar no balão de diluição

Quanto foi injetado (PESO seringa cheia - vazia) ?

Relação entre Dose injetada e Dose Padrão

Qual foi o volume de diluição ? (deve ser +- 1.000 mL)

1,0
1,0
1,0
1.000

Amostras (ideal é amostras e padrão em duplicata)

Coletar amostras de sangue (10 mL + 0,2 mL heparina) no braço contra-lateral, após 120 e 240 minutos

anotar intervalo exato da coleta 1 amostra

anotar intervalo exato da coleta 2 amostra

Centrifugar a 1500 g por 5 minutos e separar 3 mL de plasma em cada amostra (anotar volume exato)

Separar 3 mL do padrão (anotar volume exato)

AMOSTRA EXTRA 1 (anotar horário exato da coleta)

120	em geral = 120 min
240	em geral = 240 min

ex: 360 ou 480 minutos para IF

AMOSTRA EXTRA 2 (anotar horário exato da coleta)				ex: 360 ou 480 minutos para IF			
Contagem: (energia =320 keV e T1/2 27 dias)				corr BG			
CONTAR BG na janela do Cr51 (se for subtração automática deixar BG=0)							
CONTAR PLASMA 120min				522	2	261	contage
CONTAR PLASMA 240 min				137,9	2	68,95	
CONTAR PADRÃO				15524,1	2	7762,05	
CONTAR AMOSTRA EXTRA 1				0		#DIV/0!	
CONTAR AMOSTRA EXTRA 2				0		#DIV/0!	
Escreva				acima:			
CREATININA				PLASMÁTICA			
Gravidez/amamentação							
Cintilografia							
Medicações em uso				recente			

Provas de função RENAL

- J Nucl Med 1996; 37:1883-90 Report of the Radionuclide in Nephrourology Comitte on Renal Clearance.
- Eur J Nucl Med (2003) 30:4-8 - clearance plasmático de EDTA até 4 hs superestima excreção urinária em 10% (Obs: Chanter já corrige isso !)
- Eur J Nucl Med BP31-6 guidelines em pediatria
- EJNM 1992 19:30-5 2 amostras para 10 a 30 ml e 1 amostra para > 30 ml/min
- EJNM 1994 21:12-6 valor normal por faixa etária (até 17 anos), (calria p/105ml/min na faixa 2-17 anos com corr. de Brochmer)
- Semin Nuc Med 23 1993 73-86 Bubeck propõe que nos métodos de amostra única com equação empírica baseada em adultos (ex: Groth) se faça correção da superfície corpórea na amostra e não no v

Apêndice I – Planilha de procedimentos utilizada na rotina da Clinica de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.