ADRIANA CAROPREZO MORINI

Efeitos da ciclosporina A sobre a função renal e hepática de cães da raça Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular

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:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

Co-orientadora:

Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho

São Paulo
2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1598
FMVZ

Morini, Adriana Caroprezio

Efeitos da ciclosporina A sobre a função renal e hepática de cães da raça Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular / Adriana Caroprezio Morini. – São Paulo: A. C. Morini, 2005.

106 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2005.

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.

Co-orientadora: Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho.

1. Imunossupressão. 2. Nefrotoxicidade. 3. Distrofia muscular animal. 4. Hepatotoxicidade. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da ciclosporina A sobre a função renal e hepática de cães da raça Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular", protocolo nº683/2005, utilizando 09 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Effect of cyclosporina A on renal and hepatic functions of normal Golden Retriever dogs and of Golden Retriever with muscular dystrophy (GRMD)", protocol number 683/2005, utilizing 09 dogs, under the responsibility of Profª Drª Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 20 de maio de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MORINI, Adriana Caroprezio

Título: Efeitos da ciclosporina A sobre a função renal e hepática de cães da raça Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular

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: ____/____/2005

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei
Todo mundo ama um dia, todo mundo chora, um dia a gente chega, no outro vai embora,
cada um de nós compõe a sua história, e cada ser em si carrega o dom de ser capaz, e ser
feliz.”*

(Almir Sater e Renato Teixeira)

DEDICATÓRIA

A Deus

Ainda que eu caminhe pelo vale das sombras nada temerei, pois o Senhor está comigo.

DEDICATÓRIA

*A meus pais João Carlos Morini e Zuleida Caroprezo Morini
O amor incontestável de vocês foi, e é, o que me dá força e vontade de querer ser cada vez
mais digna dele e nunca decepcioná-los. Amo muito vocês!!!
Dizem que família agente não escolhe...eu, no lugar D'ELÉ, não teria feito melhor.
Muito Obrigada!*

DEDICATÓRIA

A meu irmão João Carlos Morini Júnior

Pelo exemplo de força de vontade, designação e fé, que uniu ainda mais a todos nós.

DEDICATÓRIA

O meu avô João Morini (in memorian)

À minha avó Laura Amadi Morini

À minha avó Cinira Pavão Caroprezo

A meu avô (in memorian) Roque Caroprezo

*Por estarem SEMPRE ao meu lado, por todo o carinho e principalmente a minha querida
vózinha (VÉIA), por me acolher e me suportar, dividindo comigo todos os momentos bons e
ruins de mais essa etapa da minha vida.*

DEDICATÓRIA

*Aos meus fiéis companheiros Winnie (in memorian), Princesa, Scotch, Fiel I (in memorian),
Fiel II, Cliff, Roger (in memorian) e Sargento (in memorian).*

*Ao MEU cão, aquele que me escolheu para dever obediência, cumplicidade, amizade e
fidelidade – Whiskey.*

*Aos que me proporcionaram horas mais do que agradáveis de liberdade Jungle, Hiffa, Arian
(in memorian) e Joe Top Cody (Jay).*

Todos vocês me deram a certeza de que a profissão que escolhi é, dentre todas, a melhor!

DEDICATÓRIA

*A todos os cães pertencentes ao Canil GRMD Brasil que foram e são exemplo de força de
vontade e alegria de viver.*

*Ao Peter em especial por ter sido o primeiro a conviver e me ensinar a real importância desse
grande projeto e o valor de uma verdadeira amizade.*

AGRADECIMENTOS

À Profa^a Dr^a Maria Angélica Miglino que me ensinou muito além da ciência, cada um dos momentos foram e serão para sempre recordados e utilizados durante minha vida acadêmica e pessoal. Agradeço pela confiança, pulso firme, amizade e ensinamentos compartilhados.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Mayana Zatz por me receber em sua equipe e confiar a mim papel importante no andamento de suas pesquisas, ainda por transmitir sempre esperança e estímulo, tamanha a própria luta que enfrenta. Orgulha-me saber que contribui de alguma forma.

À Prof^ª Dr^ª Mariléda Bonafim Carvalho. pela paciência e pela dedicação a esse estudo, agradeço.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. ¹ Eurípedes Ferreira do Hospital Israelita Albert Einstein, primeiramente pela contribuição ao estudo cientificamente e tecnicamente, mas acima de tudo pelo carinho, dedicação, alegria e confiança distribuídas à nossa equipe cada vez que foi solicitado.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira por auxiliar nas análises estatísticas da pesquisa com extrema competência e atenção aos dados.

Prof Dr José Roberto Kfoury por ceder as instalações de seu laboratório para realização parcial dos exames desse estudo, mas principalmente por ter trabalhando consigo pessoas que me foram muito especiais como às amigas Lílian, Janaína e Rose.

Prof Dr. Eduardo Birgel por ceder as instalações de seu laboratório para realização parcial dos exames desse estudo.

¹ Medico

AGRADECIMENTOS

À Daniele dos Santos Martins, por sua alegria, entusiasmo, garra e tudo mais que se aplica a uma pessoa que por maior que seja o problema sempre acha a solução, não há como não querer estar perto e compartilhar desses mesmos sentimentos. Por possuir extrema inteligência e utilizá-la apenas e tão somente para o bem.

Ao Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, pesquisador, orientador, líder, pai adotivo e acima de tudo amigo que se mantém fiel e sempre presente. Agradeço por estar sempre ao meu lado, juntamente com a Dani, se preocupando acima de tudo com a pessoa Adriana.

AGRADECIMENTOS

Aos que fizeram parte do canil GRMD Brasil, M.V. Angélica Paula Grando, M.V. Robson Giglio, M.V. Ana Rita de Lima, M.V. Daniele Scandolara Gonçalves, M.V. Érica R. Branco, M.V. Vivian Y. Samoto, M.V. Guilherme J. B. C. Ferreira, B². Myriam Alberto, B. Fabiana, I.C. Cleber Augusto Fontana, I.C.³ Débora; a convivência deixou saudades, além de profundo respeito e amizade.

À mesma equipe Canil GRMD Brasil atualmente constituída pela M.V. Daniele dos Santos Martins, M.V. Carlos Eduardo Ambrósio, M.V. Alida Abatemarco Catelli, M.V. Marta Maria Rocha Pinto Luppi, M.V. Carla Fabiana Casagrande, M.V. Marina P. Brólio, M.V. Cristiane V. Wenceslau, Fis.⁴ Thais Peixoto Gaiad, M.V. Flávio Ribeiro Alves e M.V. André Gatti, I.C. Felipe Martins dos Santos, I.C. Cláudia Medina, I.C. Leandro Vlach, I.C. Júlia Só Severo e I.C. Priscila Watanabe, por sempre priorizarem a amizade, competência e profissionalismo nesse estudo. Ao nosso funcionário Augusto pela dedicação aos cães. À M.V. Denise Simões pelo auxílio que nos deu a todos do canil e por nos trazer a V.⁵ Fernanda.

À M.V. Lillian de Jesus Oliveira pela profunda amizade, dedicação e carinho por mim.

À M.V. Ana Paula de Souza e à M.V. Ângela Akamatsu, pela amizade, pela dedicação ao estudo, e a toda equipe do Serviço de Nefrologia e Urologia da FCAV UNESP Jaboticabal, nos nomes de Sandra, Lillian, Camila, Marcy, Daniel, Alexandre, Fernanda e Marcos.

Aos funcionários do laboratório de análises bioquímicas FCAV UNESP em especial ao técnico Eugênio de Campos Filho pela dedicação e profissionalismo.

A equipe do laboratório de análises bioquímicas do Hospital Israelita Albert Einstein pela contribuição ao estudo.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ pela amizade e companheirismo, especialmente ao Ronaldo, Cauê, Maicon, Jaqueline, e Índio,, aos funcionários do HOVET da FMVZ USP especialmente aos enfermeiros Giba e Milton. E ainda a bibliotecária Elza pelos momentos de descontração neste final do estudo.

Aos grandes amigos Tatiana Bragante, Flávia Verechia e Antônio Assis, por acompanhar, compreender e respeitar a amiga.

As instituições FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

² Graduando de Iniciação Científica

³ Bióloga

⁴ Fisioterapeuta

⁵ Voluntária

⁶ Médico Veterinário

RESUMO

MORINI, A. C. **Efeitos da ciclosporina A sobre a função renal e hepática de cães da raça Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular.** [Effect of cyclosporin A on renal and hepatic functions of normal Golden Retriever dogs or Golden Retriever with muscular dystrophy]. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A distrofia muscular dos cães Golden Retriever (GRMD), uma miopatia degenerativa causada pela ausência da distrofina é geneticamente homóloga a distrofia muscular de Duchenne que acomete humanos, portanto, estes cães são considerados modelos experimentais para estudos em terapia celular. Seu sucesso depende da imunossupressão adequada. A ciclosporina A (CsA) é indicada para tal, a monitorização de suas concentrações sangüíneas e efeitos adversos são essenciais para viabilizar a terapia. Foram estudados cães GRMD, e normais da mesma raça, submetidos a terapia com CsA, associada, nos GRMD, ao transplante. Foram avaliados as concentrações sangüíneas do fármaco e seus possíveis efeitos sobre as funções renal e hepática sendo consideradas as manifestações clínicas relacionadas, urinálise, hemograma, testes de função glomerular, e concentrações séricas de uréia, creatinina, alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), cálcio, fósforo, sódio e potássio. Como resultados houve aumento discreto na uréia sérica de ambos os grupos; reações adversas como vômito, diarreia, tricose, periodontite e gengivite; diminuição dos níveis de ALT, cilindúria e proteinúria e aumento da densidade urinária no grupo dos GRMD. As concentrações séricas de CsA oscilaram muito, em seis dos oito animais. Concluímos que maiores estudos devem ser realizados quanto à função renal dos GRMD e que as doses variam

individualmente sendo de maior importância avaliar a concentração do fármaco no sangue e sua viabilização no uso da terapia celular.

Palavras-chave: Imunossupressão. Nefrotoxicidade. Distrofia muscular animal. Hepatotoxicidade.

ABSTRACT

MORINI, A. C. **Effect of cyclosporin A on renal and hepatic functions of normal Golden Retriever dogs or Golden Retriever with muscular dystrophy.** [Efeitos da ciclosporina A sobre a função renal e hepática de cães da raça Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular]. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The muscular dystrophy of Golden Retriever (GRMD) is a degenerative miopathy caused by the absence of dystrophin and it is genetically homologous of the Duchenne muscular dystrophy in humans, so, these dogs are considerably experimental models for studies on cellular therapy. Their success depends of the adequate immunosuppression. Cyclosporin A (CsA) is indicated for that, the monitoring of the blood concentration and adverse effects are essential to viabilise the therapy. It was studied GRMD dogs, and normal dogs from the same breed, submitted for therapy with CsA, associated, on GRMD, of cell transplantation. It was evaluated blood concentration of the drug, and their possible effects on renal and hepatic functions has been considered the clinic manifestations, urinalysis, blood counts, tests of glomerular function and blood concentrations of urea, creatinine, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, calcium, phosphorus, sodium and potassium. In our results we found a discrete increase of blood urea on both groups; adverse reactions like vomits, diarrhea, trichose, periodontitis and gingivitis; decrease of blood alanine aminotransferase, increased levels of urine's cylinders and protein and also increase of urinary density on GRMD group. The CsA blood concentrations oscillated too much on six than eight of our animals. We concluded that more researches want to be done to evaluate renal functions of GRMD dogs and also that the doses

varieties individually and the correct dosage as to important as the evaluation of the blood concentration of the drug and became viable for cell therapy.

Key words: Immunosuppression. Nefrototoxicity. Animal Muscular Dystrophy. Hepatotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A - Representações gráficas das médias com erros padrões relativos à função renal em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo – 2005	69
Figura 1 B - Representações gráficas das médias com erros padrões relativos à função renal em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo – 2005	73
Figura 2 - Representações gráficas das médias com erros padrões relativos a íons Cálcio e Fósforo e função hepática em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo – 2005	77
Figura 3 - Representações gráficas das médias com erros padrões dos parâmetros eritrométricos em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo – 2005	79
Figura 4 - Representações gráficas das médias com erros padrões relativos aos parâmetros leucométricos em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo – 2005	84
Figura 5 - Representações gráficas individuais das concentrações séricas de ciclosporina A em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo – 2005	86
Figura 6 - Representações gráficas dos dados de urinálise em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo – 2005	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de creatinina sérica (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	66
Tabela 2 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de uréia sérica (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005.....	67
Tabela 3 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância da razão proteína:creatinina da urina de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	68
Tabela 4 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de <i>clearance</i> de creatinina (mL/min/kg) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	71
Tabela 5 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de sódio sérico (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005.....	72
Tabela 6 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de potássio sérico (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005.....	72
Tabela 7 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de cálcio sérico (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005.....	74
Tabela 8 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de fósforo sérico (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005.....	75
Tabela 9 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de fosfatase alcalina sérica (U/L) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	75

Tabela 10 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de alanina aminotransferase sérica (U/mL) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005.....	76
Tabela 11 – Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	78
Tabela 12 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de hematócrito (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	78
Tabela 13 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de leucócitos (μL) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	80
Tabela 14 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de neutrófilos segmentados (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005.....	81
Tabela 15 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de linfócitos (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	81
Tabela 16 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de neutrófilos bastonetes (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005.....	82
Tabela 17 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de eosinófilos (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	82
Tabela 18 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de monócitos (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005	83
Tabela 19 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRN 1 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005	87

Tabela 20 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRN 2 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005	88
Tabela 21 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRN 3 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005	88
Tabela 22 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRN 4 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005	89
Tabela 23 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRMD 5 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005	89
Tabela 24 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRMD 6 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005	90
Tabela 25 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRMD 7 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005	90
Tabela 26 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRMD 8 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Distribuição das intervenções e avaliações ao longo de 30 dias de estudo de cães da raça Golden Retriever normais (G-GRN) e afetados por Distrofia Muscular (G-GRMD), submetidos a tratamento com ciclosporina A	59
Quadro 2 - Sumário dos parâmetros analisados em correspondência com as análises laboratoriais	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CsA	-	ciclosporina A	Mb	-	megabases
MMF	-	micofenolato mofetil	DNA	-	ácido desoxiribonucleico
FK506	-	tracolimus	a. C.	-	antes de Cristo
GRMD	-	Golden Retriever com distrofia muscular	MHC	-	complexo maior de histocompatibilidade
GRN	-	Golden Retriever normal	NK	-	natural killers
®	-	firma registrada	Mg/ml	-	miligramas por mililitro
ALT	-	alanina aminotransferase	°C	-	graus celcius
FA	-	fosfatase alvalina	RIA	-	radioimunoensaio
Cr	-	creatinina	FPIA	-	imunoensaio e polarização por fluorescência
Ur	-	uréia	HPCL	-	cromatografia líquida de alta performance
Ca	-	cálcio	Ng/mL	-	nanogramas por mililitro
P	-	fósforo	Bid	-	duas vezes ao dia
Na	-	sódio	GVDH	-	doença do enxerto contra o hospedeiro
K	-	potássio	VEGF	-	fatores de inibição de injúria vascular
UI/L	-	unidades internacionais por litro	μM	-	micrometro
ng/dL	-	nanogramas por decilitro	μL	-	microlitro
ng/L	-	nanogramas por litro	SDH	-	sorbitol desidrogenase
mg/kg	-	miligramas por kilograma	LDH ₅	-	lactato desidrogenase 5
mg	-	miligrama	GLDH	-	glutamato desidrogenase
%	-	porcentagem	GGT	-	γ- gluta-aminotransferase
Ccr	-	<i>clearance</i> de creatinina endógena	UP:C	-	razão proteína-creatinina
<i>Mdx</i>	-	camundongo com distrofia muscular	EDTA	-	ácido etileno diaminotetracético
mRNA	-	ácido ribonucléico mensageiro			

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	Aspectos relacionados a distrofia muscular em humanos e cães	31
2.2	Aspectos relacionados a terapia celular	35
2.3	Aspectos relacionados a ciclosporina A	37
2.4	Aspectos relacionados a testes de função hepática.....	50
2.5	Aspectos relacionados a testes de função renal.....	51
2.6	Aspectos relacionados a eletrólitos.....	53
2.7	Aspectos relacionados à hemofunção	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1	Experimento.....	56
3.1.1	Delineamento experimental.....	57
3.2	Coleta de amostras e exames laboratoriais	61
3.2.1	Concentração sérica da ciclosporina	61
3.2.2	Hemograma.....	61
3.2.3	Urinálise.....	62
3.2.4	Bioquímicas sérica e urinária	63
3.2.5	Clearance de creatinina endógena é razão proteína: creatinina da urina.....	64
3.3.	Análise dos resultados	64
4	RESULTADOS	65
5	DISCUSSÃO	93
6	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS.....	99
	APÊNDICE	106

1 INTRODUÇÃO

Distrofias musculares em crianças e adolescentes acometem um em cada 3000 nascimentos (EMERY, 1991), sendo a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), a mais comum desordem neuromuscular recessiva ligada ao cromossomo “X”; causada pela ausência da proteína distrofina que está presente em vários tecidos e mais evidente na musculatura esquelética. Clinicamente, a DMD é caracterizada por uma severa disfunção da musculatura esquelética que leva à morte prematura (BOGDANOVICH et al., 2004).

A DMD que afeta crianças de sexo masculino é uma miopatia degenerativa progressiva geneticamente homóloga a distrofia muscular de cães da raça Golden Retriever (GRMD), a semelhança das manifestações principalmente clínicas da doença justifica o uso dos cães em modelos experimentais para diversos estudos que visam à busca de tratamentos para meninos vitimados pela doença (NGUYEN et al., 2002). Uma equipe multidisciplinar brasileira (Projeto GRMD-Brasil) avalia as possibilidades de transplantes de células tronco em cães afetados. Por se tratar de transplantes heterólogos faz-se necessário o uso de imunossupressores a fim de se evitar episódios de rejeição.

A ciclosporina A (CsA) foi introduzida em 1978, para o tratamento dos transplantes alogênicos, sua janela terapêutica é muito estreita. Seu uso necessita de determinações periódicas das concentrações sanguíneas para monitorizar a dose terapêutica, com a finalidade de obter o efeito imunossupressor ideal, reduzindo os riscos de rejeição, ou toxicidade. Sabe-se que a toxicidade da CsA atinge principalmente dois órgãos, o fígado onde em parte é metabolizada e os rins. Uma das questões importantíssimas relacionadas ao uso da CsA é o estabelecimento da

dose que possa resultar em imunossupressão adequada, com o mínimo de efeitos colaterais, para garantia do sucesso dos transplantes. Cães da raça Golden Retriever podem ser submetidos a transplante de células tronco, se for instituído protocolo imunossupressor com ciclosporina A. Contudo, o protocolo ideal deve não só promover a imunossupressão necessária, como também preservar a vida do receptor e, por conseguinte, a viabilização do transplante.

Neste estudo foram investigados os efeitos do uso do imunossupressor por via oral por períodos de 30 dias em animais normais que se estendeu para 60 dias em GRMDs devido ao fato dos mesmos estarem sob terapia celular priorizando assim a imunossupressão por um período maior para se evitar a rejeição às células transplantadas, e também foram considerados o estado clínico dos animais, bem como suas alterações bioquímicas e de urinálise.

O estudo proposto neste projeto foi elaborado e confeccionado com a finalidade de trazer subsídios imprescindíveis para a viabilização de experimentos que são conduzidos pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (IB-USP) e pela FMVZ-USP em cães da raça Golden Retriever afetados pela Distrofia Muscular (GRMD)

Dentre as inúmeras frentes de investigações em andamento, destaca-se como principal projeto a ser diretamente beneficiado pelas informações almejadas, o que trata do transplante de células tronco em animais do Canil GRMD Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A distrofia muscular de Duchenne é a mais comum desordem neuromuscular recessiva associada ao cromossomo “X”; a fraqueza muscular progressiva em meninos e nos cães Golden Retriever são fenotipicamente semelhantes. Terapias celulares e gênicas trazem esperanças para o tratamento da DMD, sendo a CsA tem muito utilizada para o tratamento e prevenção de inúmeras enfermidades e ou procedimentos de transplante de enxertos.

2.1 Aspectos relacionados à Distrofia Muscular em humanos e cães

A DMD é a mais comum desordem neuromuscular recessiva associada ao cromossomo “X”, é caracterizada pela ausência da proteína distrofina que causa degeneração progressiva do músculo esquelético e cardíaco. As crianças afetadas locomovem-se por meio de cadeiras de rodas e geralmente morrem antes dos trinta anos. (BERGMAN et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004, CHILDERS et al., 2002, KORNEGAY et al., 1999; LIU et al., 2004, NGUYEN et al., 2002; SHELTON et al., 2001).

Esse tipo de distrofia se manifesta na idade de três a cinco anos através de dificuldades na atividade locomotora, hipertrofia das panturrilhas, baixa estatura, altos níveis de atividade da creatina quinase (LIU et al., 2004) e em algumas crianças retardamento mental. Não só aumento da creatina quinase é observado, mas também o da aminotransferase, lactato desidrogenase e aldolase, que sugerem injúria hepática e podem levar a diagnósticos incorretos, nesses casos, níveis normais de gamaglutaminotranspeptidase excluem a suspeita de injúria hepática. Os

elevados níveis de atividade dessas enzimas persistem por todo o decorrer da doença (IWANNCZAK et al., 2000).

A incapacidade de andar se manifesta por volta dos dez anos de idade, a morte ocorre entre trinta anos e se dá normalmente devido à falência respiratória ou do músculo cardíaco (LIU et al., 2004).

A descoberta da proteína distrofina defeituosa na DMD permitiu a avaliação crítica e a utilização de modelos animais. As formas de distrofias musculares associadas ao “X” onde há ausência de distrofina foram descritas em camundongos *mdx*, cães GRMD e gatos. Camundongos com distrofia normalmente não manifestam sinais clínicos da doença, no caso do cão, a maioria dos sinais clínicos é semelhante aos sinais da DMD. Os cães afetados possuem fraqueza progressiva e desenvolvimento de contraturas debilitantes (BERGMAN et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004, CHILDERS et al., 2002, KORNEGAY et al., 1999; LIU et al., 2004, NGUYEN et al., 2002; SHELTON et al., 2001).

O gene da DMD é o maior dos genes conhecidos do genoma humano ocupando cerca de 2,5 Mb do DNA genômico no cromossomo X, a maioria das mutações conhecidas da DMD é devido a deleção do exon, o que provoca uma mudança no esqueleto da cadeia. A distrofina é uma grande proteína intracelular que forma a porção central do complexo protéico para a formação da membrana plasmática do músculo. Associada ao complexo protéico a mesma parece formar uma ponte molecular entre o cito esqueleto muscular e a matriz extracelular e promove um comprometimento da geração do mecanismo de estabilidade do músculo (CHILDERS et al., 2002).

Estudiosos especulam que essa proteína estabiliza a membrana das miofibras durante a contração muscular, os músculos com deficiência de distrofina têm maior

susceptibilidade a injúrias de contração que a musculatura normal. Essa idéia é sustentada pela observação de miopatias humanas onde a musculatura proximal está envolvida nas contrações excêntricas para uma maior extensão que a musculatura distal (CHILDERS et al., 2002).

O conhecido ponto de mutação do gene da distrofia que leva a deleção do exon sete do mRNA da distrofina, é quem desenvolve a fraqueza muscular progressiva no GRMD, fenotipicamente semelhante a DMD (CHILDERS et al., 2002).

Recentemente a expressão de distrofina também foi encontrada em células endoteliais de humanos e camundongos normais, a distrofina endotelial aparece para realizar funções críticas na regulação do fluxo sanguíneo, mediação da dilatação arteriolar, manutenção da expressão e sintaxe do óxido nítrico endotelial e adaptação da densidade vascular na musculatura esquelética (NGUYEN et al., 2005).

O diagnóstico de distrofia muscular nos cães se dá na primeira semana de vida baseado em provas genéticas e localização imunohistoquímica da distrofina (NGUYEN et al., 2005). Os sinais clínicos em cães progridem rapidamente entre três e seis meses de idade. DMD e GRMD são caracterizadas por uma progressiva evolução clínica que leva à morte prematura. Uma alta mortalidade é observada em GRMDs durante as duas primeiras semanas de vida, quando uma alta concentração de creatinino-quinase no soro permite um diagnóstico precoce da doença. Esta anormalidade bioquímica sugere que todos os filhotes GRMD sofrem de mionecrose neonatal. Em neonatos GRMD, o diafragma, músculos intercostais, língua e musculatura esquelética do tronco, do pescoço e da porção proximal dos membros, são particularmente afetados (BERGMAN et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004,

CHILDERS et al., 2002, KORNEGAY et al., 1999; LIU et al., 2004, NGUYEN et al., 2002; SHELTON et al., 2001).

As lesões musculares nos cães são caracterizadas por necrose maciça, que afeta principalmente cabeça, pescoço, e membros. As lesões no músculo da língua podem se iniciar ainda na vida intra-uterina. Os músculos respiratórios não suportam a necrose terminal difusa, o que resulta em insuficiência respiratória aguda e morte. Embora muitos filhotes possam morrer durante o período neonatal, dentre os sobreviventes, ao redor dos dois meses de idade, podem ser constatados sinais de regeneração muscular verificável pela imaturidade do tecido muscular através de imunohistoquímica (NGUYEN et al., 2002). Cães e humanos sofrem com repetidos ciclos de necrose muscular e posterior regeneração, causando desgaste muscular, fibrose e anormalidades posturais (NGUYEN et al., 2005).

Em estudos bioquímicos do sangue de cães com distrofia muscular altos níveis de atividade de creatina quinase, alanina aminotransferase, e aspartato aminotransferase foram encontrados principalmente em animais com idade superior a quatro semanas, em contraste a baixos níveis de sorbitol dehidrogenase. As análises ultraestruturais de tecido hepático não revelaram degeneração hepática o que conclui que o aumento da enzima ALT nesses cães é associada à severa degeneração do músculo esquelético, sem necrose hepatocelular concorrente (VALENTINE et al. 1990)

Em função da semelhança entre a DMD e a GRMD, os cães têm sido considerados modelos experimentais para diversos estudos que visam à busca de tratamentos para meninos vitimados pela doença (NGUYEN et al., 2005). Um estudo pioneiro, em desenvolvimento por equipe multidisciplinar brasileira (Projeto GRMD Brasil), dentre inúmeros objetivos, tem como escopo avaliar possibilidades de

transplantes de células tronco em cães afetados. O conjunto de medidas necessárias para realização e viabilização do transplante inclui o uso de imunossupressores.

2.2 Aspectos relacionados à terapia celular

Terapias celulares e gênicas trazem esperanças para o tratamento da DMD, no entanto enquanto a aplicação das mesmas não se torna viável, tratamentos com fármacos tornam-se cada vez mais testados; o dinitrato isosórbido pode ser clinicamente utilizado para aumentar a regeneração muscular nos casos de distrofia devido ao estímulo que o mesmo provoca para o aumento do óxido nítrico e conseqüente ativação de células satélite musculares (MARQUES et al., 2005)

O crescimento e reparo da musculatura esquelética são normalmente mediados por células satélite que contornam as fibras musculares (FLETCHER; WILTON; HOWELL, 2000). Culturas de mioblastos podem se diferenciar e contribuir para o reparo e nova formação de tecido muscular *in vivo*, a capacidade foi explorada na tentativa do desenvolvimento de mioblastos transplantados como tratamento para doenças musculares hereditárias (FLETCHER; WILTON; HOWELL, 2000).

O transplante de mioblastos vêm sendo impedido por inúmeras dificuldades, incluindo rejeições imunológicas, baixa expansão e pouca sobrevivência das células injetadas. Diferentes populações de células derivadas de músculos vêm sendo isoladas da musculatura esquelética e comportam-se de maneira diferente quando injetadas novamente na musculatura. A maioria das populações não sobrevive, e

apenas uma minoria é responsável por uma pequena formação de musculatura nova. Essa minoria tem sobrevivência distinta, lenta divisão em cultura, porém proliferação rápida após enxerto, o que sugere uma subpopulação com características de células tronco (FLETCHER; WILTON; HOWELL, 2000).

Novos rumos para o tratamento sistêmico de células base para doenças musculares hereditárias foram encontrados por pesquisadores os quais perceberam que na regeneração muscular o número de precursores miogênicos excede o número de células satélite residentes. Os progenitores indiferenciados de outros tecidos, como medula óssea migram para áreas indicativas de degeneração muscular e participam da regeneração das fibras danificadas (FERRARI et al., 1998).

Injeções intravenosas de qualquer tipo de célula tronco hematopoiética normal ou populações inovadas de células tronco derivadas de musculatura em camundongos mdx resultaram em reconstrução do comportamento hematopoiético em receptores transplantados, devido à incorporação dos derivados nucleares no músculo e a restauração parcial da expressão de distrofia em músculos afetados. Isso sugere que transplantes de diferentes populações de células tronco podem levar a novos tratamentos para a DMD bem como outras doenças (GUSSONI et al., 1999).

Estudos ainda sugerem que o desenvolvimento potencial inerte de células tronco isoladas de tecidos e órgãos pode ser mais similar do que se previu anteriormente (FLETCHER; WILTON; HOWELL, 2000).

Células provenientes do estroma da medula óssea mostraram-se eficazes e com grande potencial como agentes terapêuticos ao serem induzidas a linhagem de células de musculatura esquelética humana ou de ratos. As mesmas obtiveram 89%

de eficiência induzindo diferenciação celular para fibras musculares quando transplantadas em musculatura regenerada (DESAWA et al., 2005).

2.3 Aspectos relacionados a ciclosporina A

De acordo com Goldsby (2000), a palavra imunidade que descreve o estado de proteção contra doenças infecciosas vem do latim *immunis* que significa isenção, a primeira referência escrita a respeito do fenômeno da imunidade foi provavelmente à traçada por Tucídides, historiador da guerra da Peloponésia, descrevendo a praga de Atenas em 430 a.C. onde apenas aqueles que se recuperavam da praga poderiam cuidar dos doentes, pois não contraíam a mesma doença uma segunda vez.

A imunidade do ser vivo é dividida em imunidade natural proveniente de determinação genética cujas células envolvidas são os neutrófilos e macrófagos, que fazem fagocitose, matam e degradam enzimaticamente uma ampla variedade de microorganismos em hospedeiros não imunes; a imunidade adquirida ou específica que exige exposição prévia ao microorganismo para ser ativada, é altamente específica e possui memória, as células envolvidas nesse processo são macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas interdigitantes e foliculares, essas, juntamente com o antígeno encontrado formam moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e são apresentadas e reconhecidas por outras células do sistema imune, como os linfócitos B que produzem anticorpos contra o antígeno, e os linfócitos T citotóxicos (CD8+), helpers (CD4+) e supressores. A

imunidade humoral formada basicamente pelos anticorpos, e a imunidade celular, que não envolve anticorpos circulantes e não pode ser transferida passivamente pelo soro constituída pelas chamadas células exterminadoras naturais (NK) (JONES et al., 2000)

Atualmente as técnicas de transplantes heterólogos, tanto de órgãos quanto de células e tecidos são amplamente difundidas, sendo para tais técnicas, altamente importante à queda da resposta imune diante da implantação do enxerto, para se evitar a rejeição do mesmo. Avanços na terapia imunossupressora vêm resultando em sobrevivência excelente a curto e longo prazo de rins transplantados (FIRST, 2002).

A ciclosporina A (CsA) é utilizada como imunossupressor em transplantes de órgãos para prevenir rejeições ao enxerto e como tratamento de doenças autoimunes, é também utilizada no campo da terapia gênica como veículo quando o sistema de reparo do gene é imunogênico e o sistema imune dos receptores da terapia gênica consideram as mudanças no produto do gene e reparam as células alheias (O'HARA; COLLINS; HOWELL, 2002).

A ação da CsA é mais específica para os linfócitos T do que para os B (PAPICH, 2000). Os linfócitos T helper são seus alvos principais, embora haja também ação sobre os linfócitos T supressores (Novartis Pharma). No entanto, alguns pacientes recebendo CsA desenvolvem linfomas de células B e se não fosse por este problema a CsA seria um agente imunossupressor quase perfeito (TIZARD, 1985).

A ciclosporina, uma gordura solúvel derivada dos fungos *Tolypocladium inflatum gams* (GONCALVES et al., 2003, LIN-WANG; MANRIQUE, 2002) e, *Beauveria nivea*, apresenta-se sob a forma de polipeptídeo cíclico composto por 11

aminoácidos com importante ação imunossupressora (Novartis Pharma). É um undecapeptídeo cíclico, lipofílico neutro de peso molecular 1202 Da e com solubilidade aquosa muito baixa (0,04mg/ml a 25° C) (MURDAN; ANDRÝSEC; SON, 2005). Devido às diferenças estruturais dos peptídeos que formam as suas moléculas, a ciclosporina é classificada em tipos A, C, D e G. A ciclosporina A (CsA) foi introduzida em 1978, para o tratamento dos transplantes alogênicos. Ela possui como vantagem a baixa nefrotoxicidade e, ao contrário dos corticosteróides e das azatioprinas, não causa mielossupressão quando empregada em doses terapêuticas (LIN-WANG; MANRIQUE, 2002).

A ação da CsA se deve (1) à formação de ligação complexa entre as proteínas que interferem na entrada de cálcio na célula alterando a relação calcineurin/ciclofilina; (2) ao bloqueio da transcrição de um número significativo de genes da célula T ativada, que codificam a interleucina-2; e (3) ao aumento da expressão do TGF- β com acentuado efeito imunossupressor. A janela terapêutica da CsA é muito estreita, doses reduzidas carecem de efeito imunossupressor e doses excessivas induzem reações adversas, tais como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, distúrbios gastrintestinais, tremores, hiperplasia gengival, tricose, lesão renal irreversível, fibrose cardíaca e hipertensão arterial severa (LIN-WANG; MANRIQUE, 2002).

O metabolismo da CsA ocorre de maneira extensiva no fígado, sua meia vida no sangue ou plasma é de 14 a 17 horas, sendo excretada primariamente pela bile e em menor extensão pela urina (WOOD et al., 1983, apud: LATIMER et al., 1986).

Em se tratando de administração oral da CsA sua absorção é incompleta e depende de cada paciente individualmente. A CsA é metabolizada no fígado, no trato gastrointestinal em pequenas quantidades e nos rins. Sua eliminação

primariamente é biliar e apenas 6% da dose inicial é excretada na urina sob forma de metabólitos. Sua meia vida é de 8,4 horas (oscilando entre 5 a 18 horas); sendo o pico de concentração da mesma no sangue entre 1,5 a 2 horas após administração. Apenas 0,1% da CsA é excretada pura na urina, nem mesmo a diálise pode facilitar sua excreção (Novartis Pharma).

Por se tratar de um fármaco comprovadamente hepatotóxico e nefrotóxico o uso de CsA requer monitoração constante da creatinina sérica, seu aumento implica em redução da taxa de filtração glomerular. Os riscos de toxicidade aumentam conforme aumenta a sua concentração sanguínea e o período de tratamento. Biópsias de rim após tratamento com CsA revelaram alterações tais como vacuolização tubular, microcalcificação tubular, congestão peritubular capilar, arteriopatias e locais com fibrose intersticial e atrofia tubular. Ocasionalmente também são observadas síndrome de trombocitopenia e anemia hemolítica. Também pode ocorrer hipercalemia. Durante a administração de CsA deve ser interrompido o esquema de vacinação do paciente, ou utilizar-se de vacinas atenuadas (Novartis Pharma).

Overdose de CsA provoca emese forçada duas horas após sua ingestão, podendo ocorrer hepatotoxicidade e nefrotoxicidade transitória. Dosagens muito altas provocaram morte na maioria dos ratos, coelhos e camundongos testados (Novartis Pharma).

Ao testar o uso da CsA em gatos Latimer et al. (1986) avaliou os níveis séricos e da urina dos mesmos relacionados as funções renal e hepática, em seus resultados encontrou discreto, porém significativo, aumento da uréia sérica, nenhuma alteração significativa na densidade urinária dos animais e queda considerável dos valores da enzima ALT.

A farmacocinética da CsA é complicada pela diferença entre as formas de dosagens, presença de muitos metabólitos, interação com outras drogas e variabilidade na absorção. A formulação comercializada como Sandimmune⁷ vem sendo usada há muitos anos e, embora eficiente, tem alta variação na taxa e extensão de absorção. A nova formulação, denominada Sandimmune Neoral⁸, é uma microemulsão que tem melhores taxas de absorção (PAPICH, 2000).

O uso de CsA necessita de determinações periódicas das concentrações sangüíneas para monitorizar a dose terapêutica, com a finalidade de obter o efeito imunossupressor ideal, reduzindo os riscos de rejeição devidos a subdose do medicamento, ou toxicidade causada pelo excesso de medicamento no organismo.

Esta conduta cuidadosa com a concentração sangüínea de CsA favorece a vida útil do enxerto, também proporcionando melhor qualidade de vida ao paciente. Os custos com os pacientes também diminuem, pois, quando livres de complicações adversas, não precisarão de tratamentos complementares nem de internações hospitalares prolongadas (McANULTY; LENSMEYER 1998).

Em se tratando da absorção da CsA por via oral, aproximadamente 35% da dose total são absorvidos com o pico de concentração da mesma no sangue que ocorre três a quatro horas após sua administração. No sangue, sua distribuição se dá nas seguintes proporções: 50% nos eritrócitos, 10 a 20 % nos leucócitos, e o restante no plasma. (WOOD et al., 1983, apud: LATIMER et al., 1986).

Existem atualmente no mercado várias técnicas disponíveis para dosagem de CsA sangüínea. A cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatographic* – HPLC), a primeira técnica utilizada, fornece resultados

⁷ Sandimmune® - solução oral – Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, New Jersey.

⁸ Sandimmune Neoral® solução oral (100mg/mL) – Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, New Jersey.

bastante precisos e específicos, porém é de difícil automatização, com custo elevado e procedimentos trabalhosos (McANULTY; LENSMEYER, 1998).

A técnica de radioimunoensaio (*radioimmunoassay* – RIA) foi descrita pela primeira vez em 1981 para determinação de CsA sangüínea. Na época, representou um avanço importante, porém exigia equipamento específico e pessoal técnico especializado para manuseio do material radioativo. Em 1990, foi desenvolvido um imunoensaio monoclonal específico para a CsA, utilizando fluoresceína como marcador (*fluorescence polarization immunoassay* – FPIA) (LIN-WANG; MANRIQUE, 2002; McANULTY; LENSMEYER, 1998). A FPIA é um método alternativo ao RIA, com as vantagens de ser rápido, de fácil execução e reprodutível, sem apresentar as desvantagens do RIA com relação a tempo de validade dos reagentes, manipulação e descarte de material radiativo (LIN-WANG; MANRIQUE, 2002).

A CsA tem grande utilização em humanos para tratamento e prevenção de inúmeras enfermidades e ou procedimentos de transplante de enxertos, como em Bensoussan (2002), para prevenção da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) onde foi utilizada em dosagens de 12 a 15 mg/kg/dia durante trinta e cinco dias após o procedimento de transplante de células de sangue periférico de HLA-genótipo proveniente da irmã do paciente. Os resultados da mesma associada a outro imunossupressor, o Micofenolato mofetil (MMF), foram excelentes, sendo manifestada apenas a GVHD em grau 1 facilmente revertida e o transplante considerado um sucesso. A mesma associação também demonstrou sucesso nos estudos em cães de Hogan, et al. (2003).

A CsA foi utilizada em associação ao micofenolato mofetil (MMF) e irradiação total do corpo de cães modelos de deficiência de adesão leucocitária, a mesma foi

utilizada em doses de 15 mg/kg por via oral duas vezes ao dia durante os trinta e cinco primeiros dias, diminuindo para 7,5 mg/kg também por via oral duas vezes ao dia por mais trinta dias; foi utilizada em treze cães de quatorze meses de idade, sendo que apenas dois tiveram complicações e não mediante ao uso do fármaco (BAUER et al., 2005).

A dosagem de 15 mg/kg de CsA foi utilizada do dia anterior ao procedimento até o trigésimo quinto dia pós transplante de células tronco hematopoieticas em cães, os mesmos receberam tratamento com irradiação total antes do transplante, e do primeiro ao vigésimo sétimo dia fez-se uso do MMF. Nesse estudo foram avaliados quatro grupos de cães quanto à eficiência da imunossupressão; o grupo que fez uso da associação acima descrita continha seis animais, desses, três apresentaram rejeição caracterizada pela ausência das células com fenótipo do doador; outro grupo, com doze animais recebeu a terapia acima adicionada do anticorpo monoclonal anti-CD-44 mAb S5 tendo apenas dois desses animais rejeitado o transplante (SANDMAIER et al., 2003).

Georges et al. (2000) também associou os mesmos dois imunossupressores citados no estudo acima e concluiu que doses baixas dos fármacos induzem tolerância imune e para quebrar tal tolerância eles se utilizaram marcadores de antígenos de histocompatibilidade menores.

Segundo Papich (2000) e Gonçalves et al. (2003), a CsA vem sendo utilizada na Medicina Veterinária em inúmeras situações relacionadas ao sistema imunológico, como na imunossupressão em pacientes transplantados, dermatites, fístulas perianais, ceratoconjuntivites secas e anemias imunomediadas. Uma das questões importantíssimas relacionadas ao uso da CsA é o estabelecimento da dose que possa resultar em imunossupressão adequada, com o mínimo de efeitos

colaterais, para garantia do sucesso dos transplantes. Na literatura são descritos diversos estudos realizados em cães.

Yilmaz; Sözüer; Banli (1998) testaram as doses de 5mg/kg e de 7,5mg/kg, por via intravenosa, uma vez ao dia e concluíram que os melhores resultados com relação à sobrevida dos cães após transplante renal, foram observados no grupo que recebeu a dose de 7,5mg/kg. Dunn et al. (1999), avaliaram cães Dálmatas que passaram por transplante de hepatócitos partindo do princípio que a dose de CsA oral deveria ser adequada para manutenção de concentração sanguínea de 400 a 800ng/mL, objetivando o sucesso do transplante.

Kyles et al. (2001) empregaram CsA na dose de 10mg/kg, a cada doze horas, em associação com a malononitrilánida, ajustando a dose de CsA de modo a manter concentração sérica em torno de 500ng/mL. Em outro estudo, Kyles et al. (2003), administraram a dose de 5mg/kg a cada doze horas, por via oral, com modificações subseqüentes, objetivando concentração sanguínea no valor de 250ng/mL. Gregory et al. (1992) e Katayama; McAnulty; Lensmeyer. (2002) recomendam que às doze horas entre uma administração e outra do fármaco mantenham níveis de concentração séricos em aproximadamente 500 ng/mL durante os primeiros trinta dias, para então serem reduzidos para 250 ng/mL.

Bernsteen et al. (2003) ao realizarem transplante renal em quatro cães sem raça definida, utilizaram CsA em doses de 20 mg/kg/ dia, associaram a mesma a azatioprina e predinisona, mensuraram os valores séricos de CsA periodicamente mantendo a concentração entre 400 e 500 ng/mL, dois de seus cães sobreviveram os cem dias do experimento, os outros dois foram eutanaziados devido a complicações não atribuídas a imunossupressão o que levou os autores a concluir

que o uso da CsA associada previne a rejeição aguda do rim enxertado além de ser um método fácil e de baixo custo de se prevenir à rejeição.

Cong et al. (1999) concluíram em seus estudos que a associação de CsA com metotrexano resulta em uma melhora na prevenção da GVHD em casos de transplante de células tronco hematopoiéticas de antígeno leucocitário não idêntico em modelo canino, os autores se utilizaram CsA 10 mg/kg/bid nos cinco primeiros dias e 15 mg/kg/bid do sexto ao quadragésimo quinto dias. Nesse estudo os mesmos ainda afirmam que os fármacos utilizados, ciclosporina e metotrexano, são hematopoiético, gastrointestinal, renal, neurológico e hepatotóxicos.

Gonçalves et al. (2003) afirmaram também que o uso de agentes imunossupressores, dentre eles a CsA, é reconhecido como um fator que afeta os tecidos moles do periodonto, porém não tem efeito na progressão da periodontite em ratos não influenciando na perda óssea alveolar na periodontite. Segundo O'Hara; Collins; Howell, (2002), um efeito indesejável do tratamento com a CsA foi relatado em humanos, cães e ratos: o crescimento gengival crônico. A patogênese da indução da CsA na hiperplasia gengival ainda não está completamente elucidada e tanto a indução da proliferação de fibroblastos quanto à redução na habilidade de degradação da matriz extracelular podem ser consideradas responsáveis pela patogênese.

No que se refere aos efeitos adversos, pacientes humanos apresentam misturas de grupos de sinais clínicos decorrentes de toxicidade. Em especial são citados os sinais relacionados com lesões renais, hipertensão arterial, neurotoxicidade, hepatotoxicidade e hiperplasia gengival (BOWERS, 1991). Em cães que passaram por transplante renal e, foram imunossuprimidos pelo uso de CsA,

Kyles et al. (2003) observaram que os sinais adversos mais comuns foram anorexia e diarreia que podiam ser corrigidas pela redução da dose inicial.

Ito et al. (1998) trabalhando com cães que receberam transplantes de mioblastos, mas não eram afetados pela distrofia muscular, notaram que em animais recebendo CsA (20mg/kg/dia) em associação a outros imunossupressores, como o FK506 (0,15mg/kg/dia) ou o RS-61443 (20mg/kg/dia), os efeitos adversos mais marcadamente presentes foram anorexia, vômito, gengivite e estomatite, associados à perda progressiva de peso. Todos os sinais foram revertidos progressivamente com a retirada da CsA.

Creevy (2003) realizou um experimento no qual transplantou células tronco hematopoéticas por via intravenosa em cães para inverter o fenótipo da doença da deficiência da adesão leucocitária canina. Nesse estudo os cães receptores receberam irradiação total do corpo em doses sub-letal de 200 cGy duas horas antes da infusão das células do doador para imunossuprimir o animal e também foram administrados ciclosporina do trigésimo sexto dia ao sexagésimo dia após o transplante e ácido mofetil micofenólico do dia do transplante ao vigésimo oitavo dia. Nenhuma alteração ou rejeição foi relatada nesses animais e o mix de células tronco hematopoéticas reverteu o fenótipo da deficiência da adesão leucocitária canina.

Shapiro (2002), definiu em seus estudos a imunossupressão adequada para autotransplante de ilhotas pancreáticas em cães; para tal utilizou ciclosporina, prednisona, combinação de ciclosporina e doses baixas de prednisona, tacrolimus e sua combinação com prednisona; no primeiro, segundo e terceiro grupos não houve qualquer influência do fármaco nas funções das ilhotas autotransplantadas; no entanto, quatro dos vinte cães retornaram ao quadro de diabetes; um tratado com doses baixas de prednisona, outro com doses altas da mesma e outros dois com a

combinação dos dois fármacos. Na terapia com tacrolimus também não houve alterações funcionais, no entanto após sua administração houve uma redução da sensibilidade à insulina; o último grupo que associava o tacrolimus a prednisona levou todos os cães do grupo a falência irreversível das ilhotas.

A apoptose de células tubulares contribui para a patogênese de injúrias renais. Entretanto as substâncias intracelulares ativadas no epitélio tubular são pobremente entendidas. As substâncias letais ativadas pela CsA levam a nefrotoxicidade que induz apoptose no epitélio tubular caspase dependente. Muitos grupos identificaram apoptose como um mecanismo de nefrotoxicidade da CsA, tanto “in vitro” quanto “in vivo”. A apoptose celular induzida pela CsA está relacionada principalmente com a lesão de mitocôndria e também de retículo endoplasmático, tanto na lesão de mitocôndria quanto na de retículo endoplasmático a participação da enzima caspase tem valor significativo. (JUSTO et al., 2003).

A liberação do citocromo c mitocondrial pode ter um importante papel no início do estágio final da apoptose nuclear em endotoxemias cardíacas. A CsA que quebra a liberação do citocromo c, esta apta a reduzir a indução da endotoxina cardíaca no estágio final da apoptose nuclear em casos de disfunção do miocárdio; isso não foi observado com o FK506. Os mecanismos precisos dos efeitos benéficos da CsA necessitam de maiores investigações. (FAUVEL, 2002)

Efeitos tóxicos que envolvem alguns órgãos com intensidade particular, são as maiores desvantagens na terapia com CsA. Nefrotoxicidade, perda da vascularização renal e hipertensão são os mais relevantes e indecifráveis efeitos. Injúrias vasculares são geralmente consideradas fatores comuns nos grupos de todos os tipos de induções da CsA nas perdas dos órgãos. (CAMELO et al., 2004).

Os efeitos da CsA na citoproteção e citotoxicidade em células endoteliais podem ser conduzidos melhor por CyP-mediadores que por Cn mecanismos mediadores, o VEGF tem um papel maior nos efeitos da citoproteção de CsA em baixas concentrações. Efeitos de proteção tubular do VEGF aumentaram a indução da CsA a injúria e agora são demonstrados “in vivo” abrindo novas possibilidades de interpretação patofisiológicas e terapêuticas (CARAMELO et al., 2004).

Um estudo in vitro dão suporte a hipótese de que CsA induz diretamente a morte celular de células epiteliais tubulares proximais. (BAKKER, 2002)

A cooperação entre óxido nítrico e imunossupressores que induzem o apoptose nas células epiteliais tubulares proximais pode contribuir para a toxicidade renal observada no decorrer de terapias imunossupressoras (PÉREZ et al., 2000).

A redução da CsA induzida na fluidez de membrana celular e inibição do transporte de CsA são fatores de efeitos diretos da cilastatina nas células epiteliais tubulares proximais. A distribuição inalterada de colesterol rico de membrana limitado em presença da cilastatina sugere que a mesma destina a um salto da dipeptidase, melhor que colesterol rico de membrana que limita modificações, causadas por interferências do transporte de CsA. Esses resultados promovem adição dentro dos mecanismos e escopo para a nefroproteção pela cilastatina (HORTELANO et al., 2000).

Vinte anos de uso da CsA como imunossupressor em transplantes pediátricos de coração concluíram que o melhor realmente para pacientes pediátricos é utilizar terapia imunossupressora reduzida a monoterapia ou dupla, utilizando-se da associação de dois fármacos somente. A incidência de rejeição do órgão é maior em crianças o que justifica tantos re-transplantes, dentre os 70 pacientes estudados,

oito morreram, dois tem insuficiência renal, vinte possuem níveis elevados de creatinina sérica (PARISI et al., 1998).

Em trinta anos de transplantes de fígado um estudo em 348 pacientes comparando o FK506 e a ciclosporina revelou que ambos possuem vantagens e desvantagens; os benefícios do FK506 incluem diminuição do uso de prednisona e anti-hipertensivos, já a CsA apresentou menores índices de rejeição aguda e menor número de pacientes com doenças linfoproliferativas pós-transplante (ZAJICEK et al., 2002)

Um estudo recente avaliou o uso de formulações em forma de gel como veículo oral para administração de CsA, as formulações são fáceis de preparar, estáveis, e com absorção similar a fórmula comercial Neoral® microemulsificada quando administrada por via oral em cães. As altas absorções da droga estão associadas à habilidade dos géis em captar a droga em transformá-la em uma forma solúvel quando o gel interage com os componentes gástricos aquosos (MURDAN; ANDRÝSEC; SON, 2005).

Atualmente o bloqueio da transmissão da permeabilidade mitocondrial provocado pela CsA é amplamente conhecido e ao utilizar CsA em células tubulares renais houve aumento dos níveis de oxigênio reativo intracelular em métodos dose-dependentes. A CsA especialmente em níveis de 10 μ M causa despolarização dos potenciais de membrana mitocondriais em níveis dramáticos, o que leva a crer que os efeitos da CsA sobre a despolarização são dose dependentes. No entanto baixas doses de vitamina E demonstram efeitos protetores contra os fatores da CsA indutores de apoptose e suspensão do ciclo celular, efeitos esses similares aos efeitos máximos de concentração que a prednisona promove (JEON et al., 2005)

2.4 Aspectos relacionados a testes de função hepática

Testes para avaliar as condições de normalidade do fígado podem ser divididos em testes enzimáticos séricos e testes de função e resultados anormais nos mesmos podem indicar distúrbios hepáticos primários ou secundários, no entanto é prudente considerar ainda lesões extra-hepáticas. As enzimas séricas referentes ao fígado são a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), sorbitol dehidrogenase (SDH), lactato dehidrogenase isoenzima 5 (LDH₅) e glutamato dehidrogenase (GLDH); as enzimas que aumentam subseqüentes a produção acelerada estimulada pela retenção da bile ou por medicamentos são a fosfatase alcalina (FA) e γ -gluta-aminotransferase (GGT); os testes de função envolvem a produção de albumina, uréia, fatores de coagulação e glicose; e as substâncias dependentes de processos metabólicos do órgão são a bilirrubina, ácidos biliares, amônia, colesterol e corantes (MEYER; COLES; RICH, 1992).

A ALT está presente no citoplasma dos hepatócitos de cães, gatos e primatas; uma injúria (toxina ou hipóxia) na membrana hepatocelular resulta em um aumento da atividade sérica de ALT, sabe-se que a ALT também pode aumentar secundária a injúrias musculares esqueléticas severas, que podem se confirmar ao dosar a enzima específica creatina quinase (CK), quando essa enzima está aumentada, a ALT também se altera, no entanto o aumento maior fica por conta da enzima AST (MEYER; COLES; RICH, 1992).

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima associada à membrana localizada em vários tecidos, no entanto apenas dois são importantes para questões de

diagnóstico, tecido ósseo e hepatobiliar. Exceto em animais em crescimento e com doenças ósseas o aumento da FA é usualmente originário do tecido hepatobiliar. Cães apresentam ainda aumento da FA secundário à indução medicamentosa, especialmente quanto ao uso de corticóides (MEYER; COLES; RICH, 1992).

2.5 Aspectos relacionados a testes de função renal

A densidade urinaria é a razão da massa da solução comparada com massa de igual volume de água; ela é um dos testes clínicos que se houver queda, indica perda da capacidade de concentração da urina o que indica doença tubular renal. A densidade adequada para cães deve estar em torno de 1.030, mas pode variar de 1.001 a 1.060 refletindo também o grau de hidratação do animal, valores menores que 1.012 ou ainda 1.008 exigem avaliação da função das células tubulares (MEYER; COLES; RICH, 1992).

O pH da urina depende da dieta do animal, carnívoros devem possuir pH de ácido a alcalino dependendo do nível de proteína da dieta, um aumento da acidez da urina pode ser devido à inanição, febre, acidose metabólica ou respiratória, exercício muscular prolongado, administração de sal ácido assim como amônio clorido. Um pH alcalino pode acompanhar alcalose respiratória ou metabólica, cistite bacteriana ou seguida de ingestão de bicarbonato de sódio (MEYER; COLES; RICH, 1992).

Uma quantidade pequena de proteína passa por filtração glomerular, mas é reabsorvida pelos túbulos renais, conseqüentemente, uma urina normal não deve possuir proteína; em urinas com densidade alta 1.050 pode-se considerar normal

uma cruz na tira reagente, que indica até 30 mg de proteína encontradas na urina. Uma proteinúria transitória pode ocorrer associada à febre, exercício muscular e seqüestro. Um falso positivo na tira reagente pode ocorrer em casos de urina muito alcalina, pH maior que 8,5 (MEYER; COLES; RICH, 1992).

A significância da perda de proteína pelos rins através da urina pode ser determinada pelo cálculo da razão proteína creatinina (UP:C); os valores considerados normais para cães não devem ultrapassar 1.0.

Ao analisar o sedimento urinário o ideal para cães são dois ou menos cilindros hialinos, e ou granulares o que indicam renovação contínua celular, no entanto valores superiores a esse ou cilindros do tipo céreo ou celular são indicativos de doença renal como necrose tubular aguda (MEYER; COLES; RICH, 1992).

Os testes de função renal séricos mais utilizados consistem na dosagem de uréia produto do catabolismo protéico de carnívoros e onívoros. Ao passar pelos glomérulos, 25 a 40% da uréia já filtrada é reabsorvida; a diminuição desses valores indica aumento na produção de urina que dificulta a reabsorção, o aumento de uréia no sangue indica aumento da proteína na dieta, ou queda da quebra de catabólitos dos tecidos ou ainda hemorragia do trato gastrointestinal, nesse caso os valores de creatinina não se alteram. Um aumento de seus níveis pode indicar desidratação, doença cardiovascular, hemorragia intestinal, aumento da proteína na dieta ou choque, se acompanhada de aumento de densidade urinária o que indica azotemia pré renal; insuficiência renal quando acompanhada principalmente de proteinúria; ou ainda obstrução ou ruptura do trato urinário, sendo, portanto azotemia pós renal (MEYER; COLES; RICH, 1992).

A creatinina é formada durante o metabolismo músculo esquelético, a mesma assim como a uréia também passa pela filtração dos glomérulos, e se houver queda na filtração glomerular há um aumento de seus níveis sanguíneos, indicando as mesmas doenças relacionadas à azotemia, exceto influência da dieta e hemorragia intestinal. Perda muscular severa reduz a quantidade de creatinina formada (MEYER; COLES; RICH, 1992).

O chamado *clearance* de creatinina endógena avalia os níveis de creatinina excretados pela urina e sangue durante certo período que pode variar de acordo com a técnica empregada; no entanto seus valores não devem ultrapassar a faixa entre 2,19 a 4,1 em gatos de idade entre 4 a 24 semanas (MEYER; COLES; RICH, 1992).

2.6 Aspectos relacionados a eletrólitos

As mais comuns ocorrências que promovem o desequilíbrio dos eletrólitos são: vômito, diarreia e poliúria. Sódio é o principal íon extracelular e potássio é o principal intracelular. A hiponatremia pode estar associada dentre outros a uso de diuréticos e administração de fluídos hipotônicos, já a hipernatremia pode ocorrer em casos de falência renal aguda ou crônica. Hipocalcemia ocorre em acidose tubular renal, falência renal crônica, terapia com bicarbonato ou diuréticos e alcalose; a hipercalemia se dá por falência renal incluindo obstrução de uretra, morte de células difusas, secundária ao choque e acidose dentre outras (MEYER; COLES; RICH, 1992).

O aumento dos valores séricos de fósforo pode indicar dentre outros a diminuição da filtração glomerular, animais em crescimento, dieta com excesso de fósforo, e uso de medicamentos como esteróides anabólicos, furosemida, minociclina e hidroclorotriazina (MEYER; COLES; RICH, 1992).

Diminuição dos valores de sódio, aumento dos de potássio, assim como aumento das excreções de cálcio e fósforo também são indicativos de alterações renais (MEYER; COLES; RICH, 1992).

2.7 Aspectos relacionados à hemofunção

A forma mais comum de se avaliar a porcentagem do volume celular é através do microhematócrito. Para contagem total de eritrócitos pode ser feita através do contador eletrônico contanto que o mesmo esteja regulado para a espécie a ser analisada; os eritrócitos têm tamanhos diferentes conforme a espécie, sendo semelhantes em humanos e cães; contudo a contagem também pode ser realizada manualmente; valores inferiores indicam anemia podendo ser normocítica, macrocítica ou microcítica dependendo do tamanho dos eritrócitos; valores superiores aos denominados padrão indicam policitemia (MEYER; COLES; RICH, 1992).

Todos os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) possuem aproximadamente 10 horas de tempo de circulação sangüínea, depois desse período há a renovação celular promovida pela medula óssea. Neutrófilos são responsáveis por fagocitar bactérias, estão associados a reações inflamatórias

secundárias a bactéria, doenças imunomediadas e necrose tecidual não específica; a forma mais jovem do neutrófilo denominado segmentado é chamada de neutrófilo bastonete e aparece quando há necessidade de maior número de neutrófilos e não há tempo para sua maturação (MEYER; COLES; RICH, 1992).

A contagem total de neutrófilos em cães também pode ser realizada eletrônica ou manualmente; já a contagem diferencial é feita manualmente através de esfregaço sanguíneo (MEYER; COLES; RICH, 1992).

O eosinófilo é moderador de reações que ocorrem quando células do tecido e basófilos degranulam. Eles contêm substâncias como histamina, leucotrieno e fatores de ativação de plaquetas que inativam fatores de liberação dos basófilos e células teciduais (MEYER; COLES; RICH, 1992).

Os linfócitos têm seus precursores originados durante a vida fetal e se desenvolvem no timo e bursa transformando-se em do tipo T e B respectivamente; após o nascimento os mesmos passam a ser produzidos no baço, linfonodos e tecido intestinal associado a tecido linfático; sua vida útil varia de meses a anos e os tipos são indistinguíveis na contagem diferenciada de leucócitos; sua principal função é relacionada à atividade imunológica, os do tipo T e sua progênie atuam na imunidade celular mediadora o que inclui rejeição a enxertos, doença do enxerto contra hospedeiro, hipersensibilidade tardia defesa contra organismos intracelulares e contra neoplasia; os do tipo B são responsáveis pela produção de anticorpos (MEYER; COLES; RICH, 1992).

Os monócitos são formados no sangue da mesma origem dos granulócitos e sua função consiste em migrar para os tecidos lesados para transformar-se em macrófago e então realizar fagocitose defendendo o corpo contra a invasão de microorganismos (MEYER; COLES; RICH, 1992).

3 MATERIAIS e MÉTODOS

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

3.1 Experimento

Foram utilizados no experimento quatro cães da raça Golden Retriever normais e quatro afetados pela distrofia muscular (GRMD), pertencentes ao grupo de animais do canil GRMD Brasil localizado no Departamento de Anatomia e Cirurgia da FMVZ-USP.

Foram considerados animais afetados pela distrofia muscular, os cães Golden Retriever do sexo masculino submetidos ao exame de genotipagem, através da extração de DNA genômico do sangue de cordão umbilical, realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano, da Universidade de São Paulo. O exame compreende na identificação da mutação de ponto, do sítio 3' de *splice*, do *intron* 6 do gene da distrofina, essa mutação leva a perda do *exon* 7 durante o processamento do mRNA gerando um *stop códon* do *exon* 8 e um peptídeo com 5% do tamanho normal da proteína distrofina. Cães considerados normais partem do mesmo processo de exame de genotipagem, porém sem constar a mutação a que se refere à doença.

Todos os animais pertencentes ao canil foram mantidos sob condições adequadas de cuidados médicos veterinários, alimentação, higiene, e recreação.

3.1.1 Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos em dois grupos, um composto por quatro Golden Retrievers Normais (G-GRN), e outro composto por quatro cães Golden Retrievers afetados pela Distrofia Muscular (G-GRMD).

Os animais G-GRMD receberam ciclosporina A e foram submetidos a transplante de células tronco de cordão umbilical. Os animais pertencentes ao G-GRN receberam somente tratamento com ciclosporina A. O imunossupressor empregado teve sua dosagem variando entre 1mg/kg a 10mg/kg, a cada doze horas, por um período de 30 dias para os cães normais e de até 67 dias para os transplantados. As doses foram ajustadas, caso a caso, ao longo do tratamento na tentativa de manter concentrações séricas variando entre 250 a 500 ng/L.

O transplante de celular (somente para os G-GRMD) foi realizado pela equipe do IB-USP e da FMVZ-USP, de acordo com protocolo estabelecido em projeto próprio.

No dia um do experimento, antes de qualquer administração de CsA ou do transplante, foram realizadas todas as avaliações propostas e seus resultados considerados como valores basais (controle). Ao longo do período de tratamento, iniciado no dia dois do experimento (duração de 30 ou de até 67 dias) foram avaliados os parâmetros relativos às funções hepática e renal e mensuradas as concentrações séricas da CsA com o objetivo de verificar possíveis efeitos do tratamento. O Quadro 1 apresenta o sumário das intervenções e avaliações realizadas, de acordo com os dias de experimento e no Quadro 2 são descritas as análises laboratoriais de acordo com cada parâmetro a ser avaliado.

Todos os animais receberam acompanhamento e os cuidados médicos que se fizeram necessários em função do transplante e dos efeitos colaterais do imunossupressor. Para tanto os animais foram assistidos ininterruptamente (24 horas por dia) por um ou mais membros da equipe em regime de plantões de seis a oito horas. Os cuidados regulares incluíram procedimentos de higiene, alimentação, administração da CsA e avaliação clínica. Foram avaliados diariamente o peso corporal, ingestão de água e alimento, frequências cardíaca e respiratória, temperatura interna, hidratação, estado geral, defecação e qualidade das fezes, micção e qualidade da urina (Apêndice 1). Exame clínico completo era executado caso fossem notadas quaisquer alterações.

Problemas com a ingestão de alimento ou de água, esperados nos cães GRMD, foram resolvidos com ração *super premium* triturada e adicionada de água oferecida em comedouros suspensos ou manualmente introduzida próxima a base da língua na cavidade oral para facilitar a deglutição, modificação da consistência da água pela agregação de gelatina sem sabor e administração através de seringa. Alteração no protocolo anestésico, antes inalatório, para anestesia local nos pontos destinados às biópsias e injeções de células.

Quando necessário os animais receberam fluidoterapia, além de tratamento sintomático e de suporte.

Quadro 1 – Distribuição das intervenções e avaliações ao longo de 30 dias de estudo de cães da raça Golden Retriever normais (G-GRN) e de 67 dias no caso dos afetados por Distrofia Muscular (G-GRMD), submetidos a tratamento com ciclosporina A.

momentos/intervenções			Avaliações							
Semanas	Dias	CsA	[CsA]	Hemo	Perfil Hepático	Ccr	Urina UP: C	Perfil complem.	Exame Clínico	Urinálise
	1									
Primeira	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
Segunda	9									
	10									
	11									
	12									
	13									
	14									
	15									
Terceira	16									
	17									
	18									
	19									
	20									
	21									
	22									
Quarta	23									
	24									
	25									
	26									
	27									
	28									
	29									

CsA – administração de ciclosporina; [CsA] – concentração sangüínea de ciclosporina; Hemo – hemograma; Ccr – *clearance* de creatinina; urina – urinálise; UP:C – razão proteína/creatinina da urina; perfil complem. – perfil sérico complementar; Vol. urina – volume de urina produzida em 24 horas.

■ transplante de células tronco (G-GRMD) ■ administrações de CsA ■ avaliações

Quadro 2 – Sumário dos parâmetros analisados em correspondência com as análises laboratoriais.

Parâmetros Analisados	análises laboratoriais		
	urina	Sangue	Soro
Concentração Sangüínea de Ciclosporina A [CsA]	-	Radioimunoensaio (RIE)	-
Hemograma (hemo)	-	Contagem total Hematócrito Diferencial de leucócitos	-
Perfil Hepático	-	-	Fosfatase Alcalina Alaninaminotransferase
<i>Clearance</i> de creatinina (Ccr)	Creatinina	-	Creatinina
Urinálise (urina)	Análise físico- química Sedimentoscopia	-	-
Razão Proteína: Creatinina Urinárias (UP: C)	Creatinina Proteína	-	-
Perfil Complementar	-	-	Uréia Cálcio Fósforo Sódio Potássio

3.2 Coleta de amostras e exames laboratoriais

As coletas eram realizadas nas datas descritas no quadro 1 da seguinte maneira:

3.2.1 Concentração sérica da ciclosporina

Amostras de sangue eram coletadas por meio de punção da veia jugular ou cefálica em volume de aproximadamente 2mL de cada animal e acondicionadas em tubos contendo o anticoagulante ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10%, em seguida eram encaminhadas ao Laboratório de Análises Bioquímicas do Hospital Israelita Albert Einstein para dosagem por meio da técnica de imunoensaio monoclonal denominado *fluorescence polarization immunoassay* – FPIA, gentilmente autorizado pelo Dr. Eurípides Ferreira.

3.2.2 Hemograma

Por meio de punção da veia jugular ou cefálica, foi coletado 1mL de sangue, de cada animal, para realização de hemogramas. Como anticoagulante foi utilizado EDTA a 10%.

As amostras de sangue foram avaliadas no Laboratório de Análises Imunohistoquímicas (LTIAM) do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ – USP, sob autorização do Prof. Dr. José Roberto Kfoury. Utilizou-se o método de diluição e contagem manual em câmara de Neubauer⁹ que foram examinadas em microscópio¹⁰ com aumento de 400x para contagem de hemáceas e com aumento de 100x para contagem de leucócitos. Esfregaços de sangue foram preparados e corados pelo corante Wright ou por panótipo rápido, para estudo dos elementos figurados do sangue. Em seguida, as preparações citoscópicas foram examinadas ao microscópio com aumento 1000x (imersor) para diferenciação e contagem dos leucócitos. O volume globular foi avaliado pela técnica do microhematócrito no Laboratório de Análises do Setor de Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica Médica da FMVZ – USP, autorizado pelo Prof. Dr. Eduardo Birgel.

3.2.3 Urinálise

As amostras de urina foram coletadas por meio de micção espontânea (jato médio) e os exames foram realizados imediatamente após a coleta, nas próprias dependências do Canil GRMD - Brasil. A densidade urinária foi determinada por meio de refratometria¹¹. O pH urinário foi determinado através de pHmetro¹². Os demais parâmetros bioquímicos da urinálise de rotina foram mensurados por meio

⁹ Câmara de Neubauer Improved Bright Line

¹⁰ Nikon eclipse E-200

¹¹ Refratometro UGI (1000-1050) Atago

¹² Phmetro de bolso Q-400 BD QUIMIS

de tiras reagentes¹³. A sedimentoscopia foi feita em microscópio² com aumento de 250 a 400x, após centrifugação¹⁴ da urina.

3.2.4 Bioquímicas sérica e urinária

As análises bioquímicas séricas e urinárias foram feitas em amostras do soro obtidas após sinérese de sangue coletado por punção das veias jugular ou cefálica, no Laboratório de Patologia Clínica da UNESP - Jaboticabal, autorizados pela Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho.

Utilizando o sistema Labtest¹⁵ para diagnóstico, alíquotas das amostras de soro foram processadas para determinação de creatinina (método de Jaffé¹⁶ modificado); uréia (UV-cinética – pelo método do diacetil modificado); fosfatase alcalina (Roy modificado); alaninaminotransferase (UV – cinético); cálcio (Labtest); fósforo (Daly e Ertingshausen); sódio e potássio (eletrodo íon-seletivo).

Nas amostras de urina foram determinadas às concentrações de creatinina (método cinético – Jaffé modificado); proteína (método vermelho de pirogalol - sensiprot); e uréia (método da uréase).

As leituras foram realizadas em dosador semi-automático para provas bioquímicas¹⁴, considerando-se a faixa visível para as respectivas provas.

¹³ COMBUR¹⁰ TEST - Boehringer Mannheim Argentina S.A., Buenos Aires.

¹⁴ Centrifuga – Celm LS3 plus

¹⁵ LABTEST Diagnóstica S.A. – Lagoa Santa, MG

¹⁶ Método do picrato alcalino

3.2.5 Clearance de creatinina endógena é Razão Proteína: Creatinina da Urina

O *clearance* de creatinina endógena, empregado para estimar a taxa de filtração glomerular, foi feito por meio da técnica de dois períodos, subseqüentes, de 20 minutos de acordo com o método descrito por Souza et al. (1999), nas próprias dependências do Canil GRMD - Brasil. A avaliação da razão proteína/creatinina da urina foi avaliada de acordo com o descrito por Finco (1995), no Laboratório de Patologia Clínica da UNESP de Jaboticabal.

3.3 Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados pelo método da análise de variância e por comparação de médias. O sistema utilizado foi o Statistical Analysis System versão 9.0, nas dependências do Departamento de Ciências Exatas da UNESP de Jaboticabal sob autorização e supervisão do Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira.

4 RESULTADOS

Os valores séricos de creatinina (tabela 1) e razão proteína/creatinina da urina (tabela 3) não variaram entre os grupos nem em função do tempo de tratamento. No que diz respeito à uréia sérica (tabela 2), embora tenham sido detectadas diferenças ($P \leq 0,01$) em relação ao tempo, os valores obtidos estavam dentro do padrão de normalidade não havendo significado clínico para o achado. Os resultados são visualizados em representações gráficas contidas na Figura 1A.

Tabela 1 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de creatinina sérica (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	0,72±0,12	0,76±0,18	
4	0,78±0,14	0,71±0,17	
8	0,73±0,11	0,56±0,09	
11	0,71±0,13	0,68±0,13	
15	0,76±0,13	0,71±0,15	
18	0,78±0,20	0,71±0,18	
22	0,89±0,08	0,68±0,11	
25	0,70±0,15	0,73±0,22	
29	0,78±0,16	0,61±0,19	
C.V. 14,71%	F grupos 0,49 ^{NS}	F tempo 0,59 ^{NS}	F grupo x tempo 1,11 ^{NS}

NS - não significativo.

Tabela 2 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de uréia sérica (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	15,66±3,78	27,66±3,78	
4	26,75±4,85	23,25±2,62	
8	34,25±14,52	38,00±12,28	
11	30,25±11,26	32,50±3,32	
15	34,00±16,30	38,50±13,69	
18	35,00±11,22	33,75±8,38	
22	32,33±16,28	30,25±4,92	
25	34,75±16,87	23,25±1,89	
29	30,00±12,00	35,00±15,47	
C.V. 22,02%	F grupos 0,02 ^{NS}	F tempo 2,83 [*]	F grupo x tempo 1,95 ^{NS}

* P≤0,05; NS - não significativo.

Tabela 3 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância da razão proteína/creatinina da urina de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	0,33±0,10	0,58±0,47	
4	0,32±0,23	0,50±0,50	
8	0,33±0,20	0,47±0,45	
11	0,20±0,11	0,47±0,36	
15	0,19±0,10	0,62±0,68	
18	0,30±0,06	0,88±0,68	
22	0,18±0,08	0,97±1,02	
25	0,49±0,35	0,79±0,43	
29	0,28±0,13	0,61±0,42	
C.V. 48,45%	F grupos 1,57^{NS}	F tempo 1,12^{NS}	F grupo x tempo 1,18^{NS}

NS - não significativo.

Figura 1^A – Representações gráficas das médias com erros padrões relativos à função renal de cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva, submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo - 2005.

A taxa de filtração glomerular estimada por meio do *clearance* de creatinina (Tabela 4) não variou de forma significativa em função dos grupos ou do tempo e todos os resultados obtidos mantiveram-se dentro dos valores de referência para a espécie. O mesmo foi observado para os valores de concentração sérica de sódio (Tabela 5). Os valores de potássio sérico (Tabela 6) diferiram ($P \leq 0,05$) nos tempos 11, 15 e 18 entre os grupos e entre os tempos 15 e 29 no grupo dos GRMD (Figura 1 B).

Tabela 4 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de *clearance* de creatinina (mL/min/kg) de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	1,87±1,03	2,95±1,35	
4		2,70±1,17	
8			
11	2,63±0,96		
15		2,66±1,95	
18	2,36±0,58		
22			
25	2,67±0,56	2,91±0,75	
29	2,94±0,38	2,89±0,36	
C.V. 25,36%	F grupos 0,83^{NS}	F tempo 0,31^{NS}	F grupo x tempo 0,98^{NS}

NS - não significativo.

Tabela 5 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de sódio sérico (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	153,00±10,81	136,00±4,58	
4	150,25±14,22	139,25±1,89	
8		136,00±6,24	
11	150,00±7,00	144,33±8,50	
15	145,00±2,82	142,25±1,25	
18	151,00±5,56	147,00±3,60	
22	144,66±6,11	152,00±11,28	
25	150,00±5,71	148,00±11,35	
29	148,00±10,36	155,75±17,96	
C.V. 5,55%	F grupos 0,17 ^{NS}	F tempo 1,50 ^{NS}	F grupo x tempo 1,57 ^{NS}

NS - não significativo.

Tabela 6 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de potássio sérico (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	5,26±0,20	4,50±0,60	
4	5,05±0,30	4,42±0,71	
8		5,03±0,25	
11	5,43±0,20 ^A	4,06±0,75 ^B	
15	5,25±0,21 ^A	4,15±0,45 ^{Ba}	
18	5,23±0,05 ^A	4,43±0,73 ^B	
22	5,23±0,15	5,05±0,81	
25	5,02±0,27	4,90±0,26	
29	4,92±0,29	5,37±0,41 ^b	
C.V. 8,98%	F grupos 4,07 ^{NS}	F tempo 1,04 ^{NS}	F grupo x tempo 2,34*

* P≤0,05.NS – não significativo. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas em linha, e minúsculas em coluna diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer.

Figura 1^B – Representações gráficas das médias com erros padrões relativos à função renal de cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva, submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo - 2005.

As concentrações séricas de cálcio (Tabela 7), fósforo (Tabela 8) e fosfatase alcalina (Tabela 9), observadas foram compatíveis com o esperado para a faixa etária dos animais estudados e não apresentaram variação significativa se considerados os grupos ou o tempo de tratamento com CsA. Entretanto, as concentrações séricas de alanina aminotransferase (Tabela 10) apresentaram-se muito aumentadas nos animais do grupo GRMD. A análise dos resultados revelou diferença ($P \leq 0,05$) entre os grupos e ao longo do tempo de estudo nos animais GRMD (Figura 2)

Tabela 7 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de cálcio sérico (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	11,01±1,04	10,54±2,13	
4	10,33±1,23	9,47±1,59	
8	10,93±1,47	11,33±2,14	
11	9,60±0,93	10,02±3,17	
15	11,26±1,20	10,79±1,60	
18	10,56±1,07	9,54±2,92	
22	11,57±1,77	9,21±1,95	
25	10,76±1,45	9,35±2,04	
29	11,33±0,81	9,39±1,62	
C.V. 12,38%	F grupos 0,78 ^{NS}	F tempo 0,71 ^{NS}	F grupo x tempo 0,79 ^{NS}

NS - não significativo.

Tabela 8 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de fósforo sérico (mg/dL) de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	6,39±0,29	7,34±2,81	
4	5,42±0,38	5,29±1,88	
8	5,63±0,55	8,82±4,51	
11	5,50±0,76	5,42±1,79	
15	7,33±2,20	6,31±0,28	
18	5,60±0,56	8,09±1,75	
22	6,63±1,58	5,43±1,15	
25	6,09±0,81	6,76±2,27	
29	5,26±0,49	5,25±1,22	
C.V. 21,63%	F grupos 0,22 ^{NS}	F tempo 1,61 ^{NS}	F grupo x tempo 1,55 ^{NS}

NS - não significativo.

Tabela 9 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de fosfatase alcalina sérica (U/L) de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	136,43±59,74	66,33±8,29	
4	156,30±50,31	60,11±19,59	
8	126,98±102,17	55,28±42,55	
11	126,46±71,42	38,64±17,28	
15	129,82±62,73	100,15±77,06	
18	157,42±54,68	41,25±30,12	
22	183,96±47,28	64,29±15,90	
25	150,01±62,80	58,13±9,68	
29	120,48±67,61	53,90±15,86	
C.V. 29,84%	F grupos 5,97 ^{NS}	F tempo 1,07 ^{NS}	F grupo*tempo 1,42 ^{NS}

**P≤0,01. NS - não significativo.

Tabela 10 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de alanina aminotransferase sérica (U/mL) de cães Golden Retriever submetidos à imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005.

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	14,70±1,73 ^A	413,85±66,53 ^{Ba}	
4	17,37±5,38 ^A	227,00±134,00 ^{Bb}	
8	16,97±7,83 ^A	228,19±161,12 ^{Bb}	
11	19,87±8,61 ^A	275,20±130,29 ^{Bb}	
15	19,69±5,01 ^A	260,13±68,35 ^{Bb}	
18	14,69±6,69 ^A	327,40±151,88 ^{Ba}	
22	24,44±8,00 ^A	259,44±151,24 ^{Bb}	
25	19,64±7,85 ^A	258,52±141,84 ^{Bb}	
29	22,05±4,80 ^A	263,34±167,46 ^{Bb}	
C.V. 23,55%	F grupos 17,10**	F tempo 2,53*	F grupo x tempo 3,13**

** P≤0,01. * P≤0,05. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas em linha, e minúsculas em coluna diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer.

Figura 2 – Representações gráficas das médias com erros padrões relativos à íons Cálcio e Fósforo e função hepática em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo - 2005

Com relação aos valores de eritrócitos (Tabela 11) e hematócrito (Tabela 12) não foram observadas diferenças significativas. Representações gráficas estão apresentadas na Figura 3.

Tabela 11 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	5,07 $\pm$ 0,60	4,47 $\pm$ 0,58	
4	6,22 $\pm$ 0,83	4,83 $\pm$ 0,37	
8	5,41 $\pm$ 0,15	5,34 $\pm$ 1,45	
11	5,29 $\pm$ 0,44	6,39 $\pm$ 1,02	
15	5,34 $\pm$ 0,87	5,16 $\pm$ 0,57	
18	5,45 $\pm$ 0,34	4,13 $\pm$ 1,85	
22	5,97 $\pm$ 0,89	5,18 $\pm$ 1,29	
25	5,78 $\pm$ 1,46	5,14 $\pm$ 1,50	
29	5,91 $\pm$ 0,84	4,44 $\pm$ 1,63	
C.V. 16,55%	F grupos 1,65^{NS}	F tempo 1,10^{NS}	F grupo x tempo 1,71^{NS}

** P $\leq$ 0,01. NS - não significativo.

Tabela 12 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de hematócrito (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	35,75 $\pm$ 2,87	30,25 $\pm$ 3,86	
4	33,50 $\pm$ 4,20	31,33 $\pm$ 7,23	
8	34,25 $\pm$ 4,64	35,00 $\pm$ 1,00	
11	34,75 $\pm$ 2,62	34,25 $\pm$ 7,13	
15	36,00 $\pm$ 3,74	37,25 $\pm$ 5,73	
18	34,00 $\pm$ 1,41	39,00 $\pm$ 6,21	
22	35,00 $\pm$ 4,24	38,75 $\pm$ 4,64	
25	32,25 $\pm$ 3,20	36,75 $\pm$ 3,77	
29	35,00 $\pm$ 2,82	41,00 $\pm$ 6,68	
C.V. 10,84%	F grupos 0,26^{NS}	F tempo 1,75^{NS}	F grupo x tempo 1,87^{NS}

NS - não significativo.

Figura 3 – Representações gráficas das médias com erros padrões dos parâmetros eritrométricos em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo - 2005

Os resultados relativos às contagens de Leucócitos totais (Tabela 13), e aos percentuais de neutrófilos bastonetes (Tabela 16) e de monócitos (Tabela 18) não variaram significativamente entre os grupos ou ao longo do período de experimento. Os valores relativos de neutrófilos segmentados (Tabela 14), linfócitos (Tabela 15) e eosinófilos (Tabela 17) apresentaram variações ($P \leq 0,01$) em função do fator tempo, contudo, não houve caracterização de evento biológico relacionado ao protocolo experimental. Todos os valores e variações podem ser visualizados em representações gráficas na Figura 4.

Tabela 13 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de leucócitos (μL) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, $n=4$) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, $n=4$ - São Paulo – 2005

Dias	Grupos	
	GRN	GRMD
1	9700,00±5317,11	9850,00±6822,39
4	14312,50±3477,88	10725,00±11121,04
8	15975,00±2422,29	9850,00±4653,22
11	15012,50±7845,21	13587,59±2818,21
15	6725,00±2750,91	14712,50±3244,07
18	9725,00±2781,04	5275,00±5774,73
22	9212,50±6051,64	10112,50±7141,82
25	11512,50±2001,41	8687,50±3150,76
29	10917,50±1058,88	9750,00±2065,99
C.V. 39,56%	F grupos 0,26^{NS}	F tempo 1,86^{NS}
		F grupo x tempo 1,74^{NS}

NS - não significativo.

Tabela 14 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de neutrófilos segmentados (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4 - São Paulo – 2005

Dias	Grupos	
	GRN	GRMD
1	54,00±7,61	63,50±9,32
4	61,25±3,77	67,25±12,25
8	67,00±4,39	65,66±12,66
11	63,75±2,62	76,00±7,07
15	61,00±6,58	72,25±6,94
18	54,00±4,08	60,25±7,58
22	69,75±5,73	76,25±1,50
25	73,00±7,43	63,75±18,69
29	64,00±5,35	72,50±5,32
C.V. 11,09%	F grupos 3,67 ^{NS}	F tempo 3,93** F grupo x tempo 1,71 ^{NS}

**P≤0,01. NS - não significativo.

Tabela 15 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de linfócitos (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005

		Grupos	
Dias	GRN		GRMD
1	34,75±3,40		29,75±9,32
4	30,00±3,46		28,25±12,65
8	26,75±2,98		21,33±18,90
11	27,75±2,21		15,00±5,71
15	31,25±9,74		19,75±9,46
18	31,75±3,09		33,75±8,01
22	23,00±3,46		18,25±2,87
25	22,00±8,12		28,50±16,62
29	27,25±6,94		17,50±3,69
C.V. 30,69%	F grupos 3,56 ^{NS}	F tempo 2,57 [*]	F grupo*tempo 1,25 ^{NS}

*P ≤0,05. NS - não significativo.

Tabela 16 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de neutrófilos bastonetes (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	2,75±1,70	2,25±1,70	
4	2,00±1,70	1,50±0,57	
8	3,00±3,36	6,00±5,00	
11	2,50±1,73	2,25±0,50	
15	1,25±1,50	4,00±1,63	
18	4,50±3,00	2,00±1,41	
22	2,75±2,62	4,00±2,94	
25	1,75±0,95	4,75±2,50	
29	2,25±1,50	3,75±2,75	
C.V. 70,58%	F grupos 0,87 ^{NS}	F tempo 0,90 ^{NS}	F grupo x tempo 1,58 ^{NS}

NS - não significativo.

Tabela 17 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de eosinófilos (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo – 2005

Dias	Grupos		
	GRN	GRMD	
1	3,00±2,44	1,25±1,25	
4	3,25±1,70	1,50±1,73	
8	1,50±0,57	1,00±1,00	
11	2,50±1,29	2,25±0,95	
15	2,50±2,08	0,25±0,50	
18	4,50±0,57	1,25±1,25	
22	2,50±1,29	0,75±0,95	
25	1,50±1,29	0,25±0,50	
29	3,25±1,70	1,50±1,29	
C.V. 66,35%	F grupos 13,56*	F tempo 2,04 ^{NS}	F grupo x tempo 1,07 ^{NS}

* P≤0,05. NS - não significativo.

Tabela 18 - Médias com desvios padrões e resultados da análise de variância dos valores de monócitos (%) de cães Golden Retriever submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, normais (GRN, n=4) e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD, n=4) - São Paulo - 2005

pela distensão muscular progressiva (GRMD, n = 4) - São Paulo - 2000			
	Grupos		
Dias	GRN		GRMD
1	5,50±3,69		3,00±1,63
4	3,50±1,91		2,50±0,57
8	1,75±0,50		8,00±8,71
11	3,25±1,70		4,50±2,08
15	4,00±2,16		3,75±2,06
18	5,00±1,41		3,00±1,63
22	2,00±1,41		4,25±3,40
25	1,75±0,50		2,75±0,50
29	3,25±2,21		4,75±2,98
C.V. 70,95%	F grupos 1,56 ^{NS}	F tempo 0,67 ^{NS}	F grupo x tempo 1,94 ^{NS}

NS - não significativo.

Figura 4 – Representações gráficas das médias com erros padrões relativos aos parâmetros leucométricos em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo - 2005

As concentrações séricas de ciclosporina, considerando cada animal individualmente, oscilaram ao longo do estudo. Foram observados picos muito altos em seis dos oito animais. Apenas o animal número 5 do grupo GRMD manteve as concentrações séricas entre 250 ng/dL e 500 ng/dL ao longo do período de tratamento. O animal número 6, do mesmo grupo, não chegou a alcançar as concentrações séricas desejáveis. Em função dos resultados apresentados para cada animal, ao longo do tempo de tratamento, ajustes da dose de CsA foram feitos, respeitando os limites propostos, com objetivo de controlar as concentrações séricas do fármaco.

No que se refere aos efeitos colaterais relacionados ao tratamento com CsA, todos os animais apresentaram diminuição do apetite de intensidade variável ao longo do período, mas sem gravidade. Um cão do grupo GRMD (número 8) apresentou reação de toxicidade à CsA caracterizada por vários episódios de vômitos e diarreia durante um período de 12 horas. Outro, dos animais do grupo GRMD (número 5), desenvolveu descamação cutânea intensa, gengivite e periodontite durante o tratamento imunossupressor.

Os resultados das urinálises, interpretados individualmente, revelaram alterações indicativas de lesões renais manifestadas após o início da terapia imunossupressora. Os resultados referentes aos parâmetros densidade, pH, e presença de proteínas e cilindros na urina dos cães normais e afetados estão apresentados nas Tabelas de 19 a 26. As médias e erros padrões dos valores de urinálise comparando os animais de ambos os grupos estão contidas em representações gráficas na Figura 6.

Tabela 19 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRN 1 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo - 2005

GRN 1			
	Média± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Densidade	1,021±1,010	1,005	1,037
pH	6,8±1,3	5	9
Proteína (mg)	6,56±12,60	0	30
Cilindro hialino*	0,03±0,18	0	1
Cilindro celular*	0,0±0,0	0	0
Cilindro granuloso*	0,03±0,18	0	1
Cilindro céreo*	0,0±0,0	0	0

* escore de cilindros: 0 = negativo; 1 = raros; 2 = 1+; 3 = 2+; 4 = 3+.

Tabela 20 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRN 2 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005

GRN 2			
	Média± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Densidade			
pH	6±1	5	8
Proteína (mg)	0,0±0,0	0	0
Cilindro hialino*	0,16±0,40	0	1
Cilindro celular*	0,0±0,0	0	0
Cilindro granuloso*	0,16±0,40	0	1
Cilindro céreo*	0,0±0,0	0	0

* escore de cilindros: 0 = negativo; 1 = raros; 2 = 1+; 3 = 2+; 4 = 3+.

Tabela 21 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRN 3 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A, São Paulo, 2005

GRN 3			
	Média± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Densidade			
pH	5,2±0,3	5	6
Proteína (mg)	0,0±0,0	0	0
Cilindro hialino*	0,0±0,0	0	0
Cilindro celular*	0,0±0,0	0	0
Cilindro granuloso*	0,33±0,81	0	2
Cilindro céreo*	0,0±0,0	0	0

* escore de cilindros: 0 = negativo; 1 = raros; 2 = 1+; 3 = 2+; 4 = 3+.

Tabela 22 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRN 4 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005

GRN 4			
	Média± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Densidade			
pH	6±1,2	5	7,5
Proteína (mg)	0,0±0,0	0	0
Cilindro hialino*	0,0±0,0	0	0
Cilindro celular*	0,0±0,0	0	0
Cilindro granuloso*	0,0±0,0	0	0
Cilindro céreo*	0,0±0,0	0	0

* escore de cilindros: 0 = negativo; 1 = raros; 2 = 1+; 3 = 2+; 4 = 3+.

Tabela 23 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRMD 5 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005

GRMD 5			
	Média± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Densidade	1,021±0,015	1,007	1,074
pH	6,4±1	5	8,5
Proteína (mg)	19,78±28,79	0	100
Cilindro hialino*	0,17±0,52	0	3
Cilindro celular*	0,06±0,25	0	1
Cilindro granuloso*	0,76±1,03	0	5
Cilindro céreo*	0,0±0,0	0	0

* escore de cilindros: 0 = negativo; 1 = raros; 2 = 1+; 3 = 2+; 4 = 3+.

Tabela 24 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRMD 6 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005

GRMD 6			
	Média± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Densidade	1,054±0,020	1,023	1,008
pH	5,9±0,8	5	8
Proteína (mg)	22,94±28,34	0	100
Cilindro hialino*	0,46±0,87	0	3
Cilindro celular*	0,03±0,17	0	1
Cilindro granuloso*	0,21±0,49	0	2
Cilindro céreo*	0,03±0,17	0	1

* escore de cilindros: 0 = negativo; 1 = raros; 2 = 1+; 3 = 2+; 4 = 3+.

Tabela 25 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRMD 7 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005

GRMD 7			
	Média± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Densidade	1,016±0,009	1,005	1,037
pH	6,9±1,2	5	9
Proteína (mg)	4,85±11,22	0	30
Cilindro hialino*	0,11±0,39	0	2
Cilindro celular*	0,0±0,0	0	0
Cilindro granuloso*	0,0±0,0	0	0
Cilindro céreo*	0,0±0,0	0	0

* escore de cilindros: 0 = negativo; 1 = raros; 2 = 1+; 3 = 2+; 4 = 3+.

Tabela 26 - Médias com desvios padrões, valores mínimo e máximo das densidades, pH, proteína e cilindros na urina do cão GRMD 8 submetidos a imunossupressão com ciclosporina A - São Paulo – 2005

GRMD 8			
	Média± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Densidade	1,029±0,008	1,012	1,041
pH	7,6±1,1	5	9
Proteína (mg)	14,83±21,58	0	100
Cilindro hialino*	0,03±0,18	0	1
Cilindro celular*	0,0±0,0	0	0
Cilindro granuloso*	0,06±0,25	0	1
Cilindro céreo*	0,0±0,0	0	0

* escore de cilindros: 0 = negativo; 1 = raros; 2 = 1+; 3 = 2+; 4 = 3+.

Figura 6 – Representações gráficas dos dados de urinálise em cães Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular progressiva submetidos ao protocolo de imunossupressão com ciclosporina A durante o período de 30 dias - São Paulo - 2005

5 DISCUSSÃO

O estabelecimento de uma dose ideal de CsA é primordial para garantir a ação de imunossupressão a fim de evitar a rejeição de enxertos, como enfatizado por Papich *et al* (2000) para tratamento de seres humanos e por Gonçalves *et al* (2003) para ratos. No estudo aqui apresentado foram utilizadas doses que variaram de 1mg/kg a 10mg/kg a cada doze horas, valores esses semelhantes aos descritos para humanos (Bensoussan *et al*, 2002), para cães (Hogan, *et al*, 2003; Yilmaz *et al*, 1998; Kyles *et al*, 2001e 2003; Bernesteen *et al*, 2003; e Cong *et al*; 1999), e também para gatos (Katayama *et al*, 2002). Em outros estudos realizados em cães foram empregadas doses maiores (Bauer *et al*, 2005; Sandmaier *et al*, 2003; Georges *et al*, 2000).

Para ser obtido o efeito de imunossupressão, mais importantes que as doses do fármaco são as concentrações plasmáticas mantidas durante as 12 horas de intervalo entre as administrações (McAnulty *et al*, 1998). Nos tratamentos imunossupressores feitos com CsA, são consideradas como concentrações plasmáticas efetivas valores entre 250ng/dL e 500ng/dL, como relatado por Bernesteen *et al* (2003), e Kyles *et al* (2001 e 2003) para cães, e por Gregory *et al* (1992) e Katayama *et al* (2002) para gatos. Entretanto, de acordo com Dunn *et al* (1999), para cães, as concentrações séricas da CsA devem ser mantidas entre 400ng/dL e 800ng/dL. Estabeleceu-se como meta para o estudo aqui apresentado, a manutenção de concentrações séricas variando entre 250ng/dL e 500ng/dL. Entretanto, houve variações nas concentrações séricas com ocorrências de picos que superavam mesmo aqueles do padrão preconizado por Dunn *et al* (1999)

apesar de terem sido administradas doses baixas. Tais achados podem refletir particularidades da raça e idade dos animais estudados e, possivelmente, interferência da condição mórbida no caso dos cães GRMD.

Quando são utilizadas doses baixas de CsA em seres humanos, podem ocorrer rejeições denominadas doenças do enxerto (Bensoussan *et al*, 2002). Em gatos, as doses baixas podem induzir imunotolerância como descrito por Georges, *et al* (2000). Por outro lado, doses mais altas são acompanhadas de reações adversas tais como anorexia, diarreia e vômitos. Os Gonden Retriever estudados apresentaram diminuição do apetite, em grau leve, ao longo do tratamento. Um único animal apresentou episódios de vômito e diarreia durante um período de 12 horas, o qual correspondeu a um dos picos de concentração sérica de CsA observados.

São relatados casos de óbito em animais de experimentação (camundongos, ratos e coelhos) em decorrência de concentrações séricas de CsA que ultrapassaram os limites seguros (Novartis Pharma, 2004). Contudo, os filhotes de Gonden Retriever estudados chegaram a apresentar concentrações séricas muito elevadas, com picos de até 1800ng/dL, sem alterações consideráveis da homeostase.

Mesmo quando a CsA é administrada em doses consideradas adequadas podem ocorrer gengivite e tricose, além da perda de apetite, como constatado Ito *et al* (1998) e O'Hara, *et al* (2002) em cães, e por Gonçalves *et al* (2003) em ratos. Dentre os cães deste experimento, apenas um (GRMD) desenvolveu gengivite, periodontite e dermatopatia caracterizada por descamação cutânea intensa.

Embora estudos façam referências às vias de administração da CsA para humanos e animais (Novartis Pharma, 2004; Cong, *et al* 1993; Bernesteen, *et al*

2003; Ito *et al*, 1998) não foram encontradas indicações específicas para pacientes afetados pela distrofia muscular. O fato do fármaco ter sido administrado por via oral, sob a forma de emulsão, facilitou o tratamento, principalmente dos cães GRMD os quais apresentam dificuldade em deglutir sólidos. A absorção também foi efetiva em pelo menos sete dos oito animais estudados como evidenciado pelas concentrações séricas detectadas.

De acordo com as afirmações de Lin Wang e Manrique (2002), Bowers *et al* (1991), Justo *et al* (2003), Caramelo *et al* (2004), Bakker *et al* (2002), Pérez *et al* (2000), Hortelano *et al* (2002), Parisi *et al* (1998) e Jeon *et al* (2005) baseadas em estudos em seres humanos e de Cong *et al* (1999) que estudaram cães, a CsA é nefrotóxica e hepatotóxica. No presente estudo foram detectados sinais de lesão de túbulos renais, caracterizados por aumento da perda de proteína na urina e cilindrúria, principalmente nos cães GRMD. Latimer *et al* (1986) observaram a ocorrência de insuficiência renal em gatos com CsA. Mas, como evidenciado pelos resultados das provas de função, os animais do presente estudo não chegaram a desenvolver insuficiência renal. Provavelmente, as medidas terapêuticas instituídas precocemente foram efetivas. Considerando as características clínicas peculiares aos animais com distrofia muscular, pode-se inferir que a doença seja um fator predisponente para o desencadeamento da agressão renal determinada pela CsA. Contudo, não foram encontrados outros relatos sobre avaliação da função renal de cães Golden Retriever com Distrofia Muscular.

Em relação à hepatotoxicidade, a CsA não determinou alteração nas concentrações séricas de fosfatase alcalina. Apesar das variações individuais observadas é possível encontrar médias maiores no grupo de cães normais.

Provavelmente, os achados estão relacionados às idades dos animais estudados.

As concentrações séricas de alanina aminotransferase apresentaram-se bem maiores nos GRMD como já relatado em meninos afetados pela DMD (Iwanniczak *et al*, 2000; Bogdanovich *et al*, 2004), e em cães distróficos (Kornegay *et al*, 1999; Shelton *et al*, 2001; Nguyen *et al*, 2003; Bergman *et al*, 2002; Childers *et al*, 2000). Não foi observada influência da CsA nos valores de alanina aminotransferase dos cães normais, contudo, os GRMDs apresentaram redução significativa das concentrações séricas da enzima durante o tratamento imunossupressor. Estes achados podem estar, de alguma forma, relacionados aos encontrados por Latimer *et al*, (1986) em testes sobre o efeito das CsA em gatos.

Com relação aos íons cálcio, fósforo e sódio não foram identificadas alterações decorrentes da administração de CsA e os valores observados encontravam-se dentro dos padrões normais (Meyer *et al*, 1992) para cães jovens. Todavia, os valores de potássio sérico, embora estivessem dentro do padrão de normalidade para a espécie tenderam a ser menores nos GRMDs.

Cong *et al*, (1993) descreveram achados de hematotoxicidade determinada pela CsA em cães, mas nenhum efeito, passível de ser detectado por meio de hemograma, foi encontrado nos cães do presente estudo.

6 CONCLUSÕES

Considerando o exposto, foi concluído que:

1. Para tratamento imunossupressor efetivo para cães, as doses de CsA requerem ajuste orientado pelos valores séricos alcançados. Podem ser requeridos tanto aumentos como diminuições de doses ao longo de um tratamento.
2. A idade dos cães é um fator importante para a determinação da dose apropriada de CsA. O Golden Retriever com idade inferior a 4 meses apresenta concentrações séricas perigosamente altas com doses que não causam o mesmo problema em animais com mais idade.
3. O efeito colateral mais proeminente em Goldens tratados com CsA é a diminuição do apetite, mas também são observados vômito e diarreia, afecções cutâneas, gengivais e periodontais. Tais problemas não foram relacionados à presença ou ausência de distrofia muscular.
4. A CsA não foi relacionada com sinais de hepatotoxicidade ou de hematotoxicidade detectáveis pelos exames realizados.
5. A terapia com CsA pode causar lesão aguda de túbulos renais, principalmente se o Golden Retriever for afetado por distrofia muscular. Entretanto, diagnóstico precoce e tratamento adequado podem prevenir o agravamento das lesões e desenvolvimento de insuficiência renal.

6. Cães da raça Golden Retriever, no que se refere aos efeitos colaterais, à homeostase de íons e à função renal, reagem de modo distinto dos indivíduos normais se forem afetados pela distrofia muscular progressiva.

REFERÊNCIAS

BAKKER, R. C.; KOOTEN, C. V.; LAGEMAAT-PAAPE, M. E. V.; DAHA, M. R.; PAUL, L. C. Renal tubular epithelial cell death and cyclosporin A. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, p. 1181-1188, 2002.

BAUER, T. R. J.; GU, Y.; TUSCHONG, L. M.; BURKHOLDER, T.; BACHER, J. D.; STAROST, M. F.; DONAHUE, R. E.; SOKOLIC, R. A.; HICKSTEIN, D. D. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation corrects the disease phenotype in the canine model of leucocyte adhesion deficiency. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 706-712, 2005.

BENSOUSSAN, D.; LE DEIST, F.; LATGER-CANNARD, V.; GRÉGOIRE, M. J.; AVINENS, O.; FEUGIER, P.; BOURDON, V.; ANDRÉ-BOTTÉ, C.; SCHIMITT, C.; JONVEAUX, P.; ELIAOU, J. F.; STOLTZ, J. F.; BORDIGONI, P. T-cell immune constitution after peripheral blood mononuclear cell transplantation in complete DiGeorge syndrome. **British Journal of Haematology**, v. 117, p. 899-906, 2002.

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

BERNSTEEN, L.; GREGORY, C. R.; KYLES, A. E.; GRIFFEY, S. M.; PATZ, J. Microemulsified cyclosporine-based immunosuppression for prevention of acute renal allograft rejection in unrelated dog preliminary experimental study. **Veterinary Surgery**, v. 32, n. 3, p. 213-219, 2003.

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.102-115, 2004.

BOWERS, L. D. Therapeutic monitoring for cyclosporine: difficulties in establishing a therapeutic window. **Clinical Biochemistry**, v. 24, p. 81-87, 1991.

CARAMELO, C.; ALVAREZ-ARROYO, M. V.; YAGÜE, S.; SUZUKI, Y.; CASTILLA, M. A.; VELASCO, L.; GONZALEZ-PACHECO, F. R.; TEJEDOR, A.. Cyclosporin A toxicity, and more: vascular endothelial growth factor (VEGF) steps forward. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 19, p. 285-288, 2004.

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

CONG, Y.; LINSLEY, P.; SEIDEL, K.; SALE, G.; DEEG, J. H.; NASH, R.; STORB, R. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4-immunoglobulin fusionprotein combined wiyh methotrexate/cyclosporine as graft-versus-host-disease prevention in a canine dog leucocyte antigen-nonidentical marrow transplant model. **Brief Communications: Immunobiology**, 1999.

CREEVY, K.E.; BAUER, T. R. J.; TUSCHONG, L. M.; EMBREE, L. J.; SILVERSTONE, A. M.; BACHER, J. D.; ROMINES, C.; GARNIER, J.; THOMAS III, M. L.; COLENDIA, L.; HICKSTEIN, D. D. Mixed chimeric hematopoietic stem cell transplant reverses the disease phenotype in canine leucocyte adhesion deficiency. **Veterinary immunology and immunopathology**. v. 95 p. 113-121, 2003.

DESAWA, M.; ISHIKAWA, H.; ITOKAZU, Y.; YOSHIHARA, T.; HOSHINO, M.; TAKEDA, S.; IDE, C.; NABESHIMA, Y. Bone Marrow Stromal Cells Generate Muscle Cells and Repair Muscle Degeneration. **Science**, v. 309, p. 314-317, 2005

DUNN, T. B.; KUMINS, N. H.; HOLMAN, D. M.; RAOFI, V.; BLANCHARD, J.; GLIMER, T.; POLLAK, R.; BENEDETTI, E. Multiple Sequential Transplantation of Hepatocytes in the Dalmatian Dog Model. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 543-544, 1999.

EMERY, A. E. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-a world survey. **Neuromuscular Disorders**, v. 1, n. 1, p. 19-29, 1991.

FAUVEL, H.; MARCHETTI, P.; OBERT, G.; JOULAIN, O.; CHOPIN, C.; FORMSTECHE, P.; NEVIÈRE, R. Protective Effects of Cyclosporin A from Endotoxin-induced Myocardial Dysfunction and Apoptosis in Rats. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 165, p. 449-455, 2002.

FERRARI, G., ANGELIS, G. C.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v. 279, p.1528-1530, 1998.

FINCO, D. R. Evaluation of renal functions In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p. 216-219.

FIRST, M. R. Immunosuppressive Agents and Their Actions. **Transplantation Proceedings**, v. 34, p. 1369-1372, 2002.

FLETCHER, S.; WILTON, S. D.; HOWELL, J. M. Gene therapy and molecular approaches to the treatment of hereditary muscular disorders. **Current option in Neurology**, v. 13, p. 553-560, 2000.

GEORGES, E. G.; STORB, R.; THOMPSON, J. D.; YU, C.; GOOLEY, T.; BRUNO, B.; NASH, R. A. Adoptive immunotherapy in canine mixed chimeras after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3262-3269, 2000.

GOLDSBY, R.A. Kuby Immunology. 4. ed. New York: W.H. Freeman and company, 2000.

GONÇALVES, P.F.; NOGUEIRA FILHO, G. R.; SALLUM, E. A.; SALLUM, A. W.; NOCITI JUNIOR, F. H. Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis – a study in rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n. 1, p. 46-50, 2003.

GREGORY, C.R.; GOURLEY, I. M.; KOCHIN, E. J.; BROADDUS, T. W. Renal transplantation for treatment of end-stage renal failure in cats. **Journal of American Veterinary Medicine Approaches**, v. 201, n. 2, p. 285-291, 1992.

GUSSONI, E.; SONEOKA, Y.; STRICKLAND, C. D.; BUZNEY, E. A.; KHAN, M. K.; FLINT, A. F.; KUNKEL, L. M.; MULLIGAN, R. C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. **Nature**, v. 401, p.390-394, 1999.

HOGAN, W.F.; LITTLE, M.; ZELLMER, E.; FRIEDETZKY, A.; DIACONESCU, R.; GISBURNE, S.; LEE, R.; KUHR, C.; STORB, R. Postgrafting immunosuppression with sirolimus and cyclosporine facilitates stable mixed hematopoietic chimerism in dogs given sublethal total body irradiation before marrow transplantation from DLA-Identical littermates. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 9, p. 489-495, 2003.

HORTELANO, S.; CASTILLA, M.; TORRES, A. M.; TEJEDOR, A.; BOSCA, L. Potentiation by Nitric Oxide of Cyclosporin A and FK506-Induced Apoptosis in Renal Proximal Tubule Cells. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 11, p. 2315-2323, 2000.

ITO, H.; VILQUIN, J.; SKUK, D.; ROY, B.; GOULET, M.; LILLE, S.; DUGRÉ, F. J.; ASSELIN, I.; ROY, R.; FARDEAU, M.; TREMBLAY, J. P. Myoblast transplantation in non-dystrophic dog. **Neuromuscular Disorders**, v. 8, p. 95-110, 1998.

IWANNCZAK, F.; STAWARSKI, A.; POTYRALA, M.; SIEDLECKA-DAWIDKO, J.; AGRAWAL, G. S. Early symptoms of Duchenne muscular dystrophy – description of cases of an 18-month-old and an 8-year-old patient. **Medical Science Monitoring**, v. 6, n. 3, p. 592-593, 2000.

JEON, S. H.; PIAO, Y. J.; CHOI, K. J.; HONG, F.; BAEK, H. W.; KANG, I.; HA, J.; KIM, S. S.; CHANG, S. Prednisolone suppresses cyclosporin A-induced apoptosis but not cell cycle arrest in MDCK cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 435, p. 382-392, 2005.

JONES, T.C. Imunopatologia. In: JONES, T.C. **Patologia Veterinária**. 6. ed. Cap. 7., p. 185-204. São Paulo: Manole, 2000.

JUSTO, P.; LORZ, C.; SANZ, A.; EGIDO, J.; ORTIZ, A. Intracellular mechanisms of Cyclosporin A – induced tubular cell apoptosis. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 14, p. 3072-3080, 2003.

KATAYAMA, M.; McANULTY, J. F. Renal Transplantation in Cats: Techniques, Complications, and Immunosuppression. **VetLearn**, v. 24, p. 874-882, 2002.

KYLES, A. E.; GREGORY, C. R.; GRIFFEY, S. M.; BERNSTEEN, L.; PIERCE, J.; LILJA, H. S.; MORRIS, R. E. Immunosuppression with a combination of the leflunomide analog, FK778, and microemulsified cyclosporine for renal transplantation in mongrel dogs. **Transplantation**, v. 75, n. 8, p. 1128-1233, 2003.

KYLES, A. E.; GREGORY, C. R.; GRIFFEY, S. M.; BERNSTEEN, L.; JACKSON, J.; MORRIS, R. E. Leflunomide Analog, MNA-715, Plus Cyclosporine Reduces Renal Allograft Rejection in Mismatched Dogs. **Transplantation Proceedings**, v. 33, p. 368-369, 2001.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, 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. 166, p. 155-121, 1999.

LATIMER, K. S.; RAKICH, P. M.; PURSWELL, B. J.; KIRCHER, I. M. Effects of cyclosporin A administration in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 11, p. 161-173, 1986.

LIN-WANG, H. T.; MANRIQUE, R. Aplicação da técnica de imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT) para dosagem de ciclosporina na amostra de sangue absorvido em papel filtro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 38, n. 1, p. 7-12, 2002.

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.

MARQUES, M.J.; LUZ, M. A. M.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H. Muscle regeneration in dystrophic *mdx* mice is enhanced by isosorbide dinitrate. **Neuroscience Letters**, v. 382, p. 342-345, 2005

McANULTY, J. F.; LENSMEYER, G. L. Comparison of high performance liquid chromatography and immunoassay methods for measurement of cyclosporine A blood concentrations after feline kidney transplantation. **Veterinary Surgery**, v. 27, p. 586-595, 1998.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Veterinary Laboratory Medicine**. Philadelphia: W. B. SAUNDERS COMPANY, 1992. p. 27-120.

MURDAN, S.; ANDRÝSEC, T.; SON, D. Nove gels and their dispersions-oral drug delivery systems for ciclosporin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 300, p. 113-124, 2005.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal Compendium of Pathology**, v. 126, n. 2-3, p.100-8, 2002.

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

NOVARTIS PHARMA. Neoral®. Soft gelatin capsules. **Neoral – cyclosporine**. Apresenta dados de literatura sobre o imunossupressor ciclosporina A, texto técnico científico. Disponível em: <www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/neoral.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2004.

O'HARA, A. J.; COLLINS, T.; HOWELL, J. M. C. Gingival eruption cysts induced by cyclosporine administration to neonatal dogs. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, p. 507-513, 2002.

PAPICH, M. G. Immunosuppressive Drugs. In: **ACVIM SEATTLE, 18., 2000, Seattle, WA. Proceedings**, p. 72-74, 2000.

PARISI, F.; ABBATTISTA, A. D.; SQUITIERI, C.; VINCIGUERRA, G.; LA VIGNA, G.; DI DONATO, R.; CATENA, G. Twelve years of cyclosporine in pediatric heart transplantation: What is the future? **Transplantation proceedings**, v. 30, p. 1967-1968, 1998.

PÉREZ, M.; CASTILLA, M.; TORRES, A. M.; LÁZARO, J. A.; SARMIENTO, E.; TEJEDOR, A. Inhibition of brush border dipeptidase with cilastatin reduces toxic accumulation of cyclosporin A in kidney proximal tubule epithelial cells. **Nephrology Dialysis Transplantation**. V. 19, p. 2445-2455, 2004.

SANDMAIER, B. M.; FUKUDA, T.; GOOLEY, T.; YU, C.; SANTOS, E. B.; STORB, R. Dog leukocyte antigen-haploidentical stem cell allografts after anti-CD44 therapy and reduced-intensity conditioning in a preclinical canine model. **Experimental Hematology**, v. 31, p. 168-175, 2003.

SHAPIRO, A. M. J.; HAO, E. G.; LAKEY, J. R. T.; FINEGOOD, D. T.; RAJOTTE, R. V.; KNETEMAN, N. M. Defining optimal immunosuppression for islet transplantation based on reduced diabetogenicity in canine islet autografts. **Transplantation**, v. 74, n. 11, p. 1522-1528, 2002.

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

SOUZA, A. P. Contribuição ao estudo dos métodos para a determinação do clearance de creatinina em cães - resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS DE PEQUENOS ANIMAIS - ANCLIVEPA, 20^o 1999, Águas de Lindóia, **Anais**, p. 34.

TIZARD, I. Vigilância e Eliminação de Células Estranhas e Anormais. In: TIZARD, I. **Introdução a Imunologia Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 1985, p. 234.

VALENTINE, B.; 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.

YILMAZ, Z., SÖZÜER, E.; BANLI, O. Effect of Combination of Cyclosporine A and Bromocriptine on Survival of Renal Alografts in Dogs. **Transplantations Proceedings**. v.30, p.839-41, 1998.

ZAJICEK, A.; ESQUIVEL, C.; MILLAN, M.; COX, K.; BERQUIST, R.; BERQUIST, W. Thirteen years' experience in pediatric liver transplantation: differences between tacrolimus and cyclosporine. **Transplantation Proceedings**, v. 34, p. 1976-1978, 2002.

APÊNDICE A - Ficha de avaliação dos animais durante o tratamento

Animal: _____ Horário: ____:____ Data: ____/____/____

Responsáveis: _____

Alimentação: _____

Cicatriz cirúrgica: _____

Estado de consciência: _____

Fezes- _____

- aspecto _____
- cor: _____
- odor: _____
- volume: _____

Frequência respiratória: _____

- tosse _____
- secreção _____
- dispnéia _____

Urina- _____

- aspecto: _____
- odor: _____
- cor: _____
- volume: _____
- densidade: _____

Pressão arterial: _____

Hidratação: _____

Ingestão de líquidos: _____

Linfonodos _____

Frequência cardíaca: _____

- tosse _____
- arritmia _____
- ruídos anormais _____

Mucosa: _____

- oral _____
- ocular _____
- genital _____

Peso corporal: _____

Temperatura retal: _____

Palpação abdominal: _____

Observações: _____