

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

**FUNÇÃO RENAL E HOMEOSTASE DE ÁGUA, SÓDIO E
POTÁSSIO EM CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER
NORMAIS, PORTADORES E AFETADOS PELA DISTROFIA
MUSCULAR**

Doutora: Ana Paula de Souza.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marileda Bonafim Carvalho.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP
– *Campus* de Jaboticabal, para obtenção do
título de doutor em Medicina Veterinária – Área
de concentração – Clínica Médica Veterinária.

Dedicatória

*“... Para viver um grande amor,
precisa muita concentração e muito siso,
muita seriedade e pouco riso
para viver um grande amor...”*

(Vinícius de Moraes)

Aos meus pais, Tirso e Sonia, pela contínua caminhada ao meu lado, me amparando nos momentos mais difíceis, partilhando comigo experiências que tornaram o percurso menos árduo e mais ameno. Por, nas horas de alegria sempre estarem junto a mim, para comemorar e estimular ainda mais. Esta conquista é mais de vocês do que minha, sem o amor dos dois, seu carinho, compreensão e apoio eu não teria chegado até aqui. Muito Obrigada! Que, um dia, eu seja tão boa mãe, quanto vocês são pais maravilhosos para mim.

“A felicidade não está em viver, mas em saber viver.”

(Carlos Drummond de Andrade)

Oferecimento

“... Por que sou do tamanho daquilo que vejo e não do tamanho da minha altura...”

(Carlo Drummond Andrade)

Ao meu irmão, André, que por todos esses anos foi uma fonte de apoio e conforto, um amigo e um protetor, zelando para que nada de mal jamais me atingisse. Sua força, carinho, amor, caráter e capacidade são para mim motivos de orgulho e alegria. Você é meu exemplo de vida, meu querido. Obrigada, muito obrigada!

A minha cunhada, Kátia, desde que você chegou a nossa vida a harmonia se instalou em nossa casa, com você só vieram coisas boas e gentis. Minha querida, você é a irmã que sempre quis ter, me orgulho muito da escolha que você e meu irmão fizeram. Obrigada por tudo!

“... A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade...”

(Carlos Drummond de Andrade)

Oferecimento Especial

“Procure ir além dos limites aos quais está acostumado.”

(Paulo Coelho)

Ao você, que apareceu quando eu já não mais acreditava que isso fosse possível, que como nos meus sonhos, veio e me salvou da mesmice do dia-a-dia, livrando-me de uma rotina que pouco a pouco estava por matar a vitalidade e a energia criativa e intelectual, que residem em mim.

Como em um sonho apareceu sem nada pedir, salvou-me de tudo o que me prendia a um passado sem vida, sem graça. Dando-me uma nova chance. Com poucas palavras e gestos fez o que sempre soube que faria: Libertou-me! “Meu herói, meu guarda... Livres é isso o que somos.”

Este trabalho é todo oferecido especialmente a você. Que nem sabe do que se trata ao certo, mas que, no fundo entende bem, apenas da autora e, por isso foi capaz de salva-la. Obrigada! Sem você, eu não teria me lembrado, de que antes de tudo e acima de tudo o mais importante é que eu me ame que eu me admire.

Foi você quem me mostrou como sou importante, para mim mesma, antes de o ser para qualquer um. Como sou inteligente, bela, e tudo o mais. E, foi você quem me ensinou que a vida é curta, que, portanto, devemos curtir-la, muito e, não apenas nos preparar para o futuro. O futuro é agora. O amanhã é incerto, nesse intervalo, tênue, reside à verdade...

*"Arriscar-se é perder o pé por algum tempo.
Não se arriscar é perder a vida..."*

(Soren Kierkegaard)

Agradecimentos

À CAPES pelo apoio e concessão de bolsa de estudos, os quais tornaram esta pesquisa possível e viável.

À Fapesp e ao CNPq, cujos auxílios financeiros viabilizaram a aquisição dos equipamentos permanentes, os quais viabilizaram este estudo.

À Professora Doutora Mariléda Bonafim Carvalho, professora assistente doutora, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV - Unesp, pelo profissionalismo, capacidade e dedicação que tornaram estes anos gratificantes.

À Professora Doutora Maria Angélica Miglino, professora titular do Departamento de Anatomia e Cirurgia Veterinárias, das FMVZ-USP, pela liberação do espaço e dos cães do Canil GRMD-Brasil, pelo profissionalismo e capacidade.

À Professora Doutora Mayana Zatz, pela liberação dos cães GRMD, pela elegância profissional e pelo exemplo a todos os pesquisadores e cientistas do Brasil.

Ao Professor Doutor Célio Raimundo Machado, professor adjunto, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da FCAV-Unesp, pela confiança e estímulos constantes no desenrolar de minha vida acadêmica. Por ser um grande modelo e exemplo a se seguir, de ser humano e profissional.

A todos os demais professores da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, por terem contribuído para esta importante etapa de minha vida pessoal e profissional.

A todos os membros do grupo de pesquisa em Nefrologia e Urologia, nas pessoas dos pós-graduandos: Alexander Martini de Brum, Angela Akamatsu, Camilla P. Camargo, Daniel Orlato, Lílian Stephanoni, Marcy Lancy e Sandra Regina Ribeiro da Silva.

Ao funcionário e amigo Marcos A. Rocha Júnior, pela amizade e infinita ajuda, prestados de forma generosa ao longo de todos esses anos de convivência.

A toda a equipe do Canil GRMD – USP, particularmente aos Médicos Veterinários Adriana Caroprezo Morini, Carlos Eduardo Ambrósio, Daniele dos Santos Martins, Marta Maria Rocha Pinto Luppi, Angélica Paula Grando, Ana Rita de Lima, Guilherme José Bolzane de Campos Ferreira, Érica Renata Branco, Carla Fabiana Casagrande, Vivian Yoshico Samoto e Robson Giglio.

A todo o pessoal do Canil Encrenquinhas, em especial a Médica Veterinária responsável pelo canil Marta M. R. P. Luppi.

A toda equipe do laboratório de patologia clínica, em especial ao: Eugênio Campos Filho, pela eterna paciência, eficiência e por tantas e tantas análises laboratoriais.

Ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, na pessoa de seu supervisor Prof. Dr. Luiz Fernando O. S. Carvalho, pela concessão das instalações.

Ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, na pessoa de sua Chefe de Departamento, Prof^a Dr^a Marileda Bonafim Carvalho, pelo apoio e liberação de pessoal e instalações.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por toda minha formação acadêmica.

Agradecimentos Especiais

*“A vida só pode ser compreendida olhando para trás,
Mas só pode ser vivida olhando para frente...”*

(Soren Kierkegaard)

À minha orientadora Professora Doutora Mariléa Bonafim Carvalho, aqui não como mestra, mas como amiga, conselheira e “mãe”, aqui registro o meu muito obrigada por tudo, absolutamente tudo. A senhora sabe que sempre foi muito mais que uma mestra, sempre foi uma amiga. Obrigada, por tudo. Foi uma honra poder estar sob sua orientação por todos estes anos. E, sempre será. Poderemos, agora, dispor de menos tempo, mas sempre teremos tempo uma para a outra, pois foi assim que se consolidou uma relação de respeito, admiração e confiança, de minha parte e de muito carinho do seu lado. Especialmente, no último ano, sem suas palavras de apoio e seu constante encorajamento não sei o que teria sido desta tese muito menos de mim. Nunca vou dizer adeus, pois sei que sempre vamos estar juntas. Obrigada!

Ao Professor Doutor Luiz Fernando O. S. Carvalho por ter em todos esses anos compreendido a dedicação de sua esposa a “essa orientada meio desmiolada”, e por especialmente, nesses últimos meses além de tudo ter me acolhido em sua casa e família, praticamente num convívio diário com gentileza e carinho, tornando minha jornada mais leve e alegre em vários momentos. Obrigada!

A toda a minha família, cada um e todos vocês, há seu tempo foi muito importante para que eu chegasse até aqui.

Aos meus padrinhos Sylvio Bendito Bodê e Vera Lúcia Bodê por todo o afeto, carinho e dedicação, que fizeram de mim uma pessoa melhor, meu muito obrigada.

Aos meus queridos “sobrinhos” Guilherme Miranda Bodê e Gustavo Miranda Bodê, vocês representam o nosso amanhã. E, são os meus dois maiores amores.

À Ângela Akamatsu quando começamos este projeto éramos apenas colegas de Faculdade, mas hoje posso dizer com segurança e certeza, depois de tudo o que passamos juntas, somos grandes amigas. O seu gesto magnânimo ao abrir mão de seu tempo para ajudar-me em meu experimento, não uma mais diversas vezes, demonstra que pessoa maravilhosa e exemplar você é. Obrigada, por ter me dado à chance de ser sua amiga. E, obrigada por tudo. Eu não teria conseguido sem sua ajuda.

A Adriana Caroprezzo Morini, obrigada pelo apoio e força nas horas mais difíceis, por ter a candura e inocência de uma menina e a coragem e determinação de uma mulher.

Ao Carlos Eduardo Ambrósio, Caju, obrigada por me convidar a participar deste projeto, acredito que houve momentos em que você se arrependeu do convite, mas já era tarde demais, não é? Já estava feito, aceito e eu, bem, eu já me encontrava no canil, tarde demais é até um eufemismo! Mas, no fim tudo acabou dando certo, pode ter sido, meio que um certo, meio incerto,

um certo diferente do que nós esperávamos, mas tudo deu certo, talvez, mais certo, do que deveria ter dado. Obrigado, muito obrigado pelo convite. E, por ter me ensinado a ter paciência.

À Gabriela de Godoy Cravo Arduino pela amizade, amor e força, sem ter você ao meu lado muito dos obstáculos teriam sido intransponíveis, foram o seu apoio e a sua censura que me fizeram seguir em frente.

À Gabriela Jaime Covizze quem diria, quem poderia imaginar, que depois de tanto tempo, uma teria algo a agradecer a outra e vice e versa, mas é como diz o ditado: “O Mundo dá voltas”. E, nas voltas dele eu descobri a pessoa maravilhosa que você é, cheia de garra, brilho, coragem, vontade de vencer, se superar, dotada de uma inteligência única. Foi maravilhoso poder trabalhar e digamos, dar uma “sofridinha” ao seu lado nestes últimos meses. Aprendi que você é uma ótima amiga, generosa e boa como poucas. Obrigada, por ter me ouvido em tantos momentos e por ter se doado, quando, também você estava extenuada. Quem sabe nas tantas voltas desse Mundão de Meu Deus a gente, ainda, não se reencontre? Tomara!

Aos meus amigos, queridos, do Serviço de Nefrologia & Urologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, desta Instituição, aos que já foram, ainda estão, e aos que virão, Érica Gil Toledo, Ângela Akamatsu, Sandra Regina Ribeiro da Silva, Camilla P. de Camargo, Glenda Barbudo Ramalho, Daniel Orlato, Liliam Stephanoni, Alexandre Martini de Brum, Marcy Lancy, Viviane Gomes Portella e Marcos Antonio da Rocha Júnior, com cada um de vocês aprendi muitas coisas, com cada um de vocês dividi

muitas coisas e a cada um entreguei meu coração, sempre estaremos todos juntos!

Aos amigos Karen Vicente, Luciany Favoretto Calzavara, Sérgio Calzavara, Maria de Jesus V. Soares, Márcio Brunetto, Melissa Abrão Copat, Daniela Margherita Panebianco, André Maurício Muscarí, e Dario Domingos Dall'Aglio, obrigada por serem meus amigos, refúgio e apoio.

As amigas Fabiana Forceto e Ana Cláudia Mendes nos últimos meses vocês foram, mais que amigas, foram meu ponto de apoio e esteio, nas horas de rir e chorar, estiveram presentes, foi com vocês que primeiro dividi os mais íntimos segredos, as maiores alegrias, os medos, as frustrações, as dores, os temores... Enfim, vocês estiveram lá o tempo todo, um maravilhoso par de ombros, mais que amigos, com os quais pude contar nos últimos meses, sem os quais não sei o que teria sido de mim. Obrigada por terem e, ainda, estarem lá e aqui para mim.

A todo o pessoal do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Jaboticabal, equipe técnica, administrativa, professores, pós-graduandos, residentes, estagiários e graduandos. Este lugar, sua história e eu passamos a ser um só em meu coração e em minhas lembranças. A cada um de vocês que conviveram comigo, ao longo de tantos anos, devo meu obrigada, muito, muito especial, sem vocês eu não teria me tornada a profissional que sou a pessoa que me tornei. Obrigada!

A todos os amigos que fiz nestes anos que passei em Jaboticabal.

E, especialmente, à cidade de Jaboticabal, por ter sido o meu lar por tantos anos, tendo me acolhido, dando-me tanto por tanto tempo e, por nunca ter me decepcionado.

A toda a equipe do Canil GRMD – USP por terem me cedido o espaço e por permitirem meu acesso aos cães deste canil.

Aos maravilhosos Golden Retrievers, do canil GRMD–Brasil, em especial ao Peter, Baco, Jonnhy, Ringo, Atchim, Frank, Zeus e Hércules. Vocês são inesquecíveis e muito especiais. Sua contribuição à ciência e a minha história de vida são inigualáveis e inesquecíveis.

A todo o pessoal do Canil Encrenquinhas, Atibaia, São Paulo, pelo apoio e ajuda ofertados com tanta gentileza e presteza. E aos lindos Goldens Retrievers, deste canil, particularmente aos incomparáveis; Califa e Malta.

A Médica Veterinária Telma Ferrante por ter acreditado em mim, me estimulado e apoiado.

Aos colegas e funcionários da Clínica Veterinária Fofinho, obrigada pela amizade e confiança.

A toda a equipe da academia Saúde Total, por me darem pique e energia extra, especialmente, agora no final!

Ao pessoal do Centro Estético Karina Zeli, como diria o poeta, que me desculpem as feias, mas beleza é fundamental. Obrigada, por me ajudarem, a me manter bela, mesmo, doida!

A Médica Psiquiatra Ana Paula Lopes Carvalho, pelo profissionalismo, dedicação e determinação, que possibilitaram o correto diagnóstico de meus problemas e seu tratamento.

Ao Médico Psiquiatra José Galucci Neto pelo profissionalismo e carinho, com os quais auxiliou de forma concreta e positiva a instituição de uma terapia, que possibilitou a minha melhora pessoal.

Ao Médico Wagner Luis Rizzo, obrigada por ter ajudado a criar a nova Ana Paula, sem sua paciência e estímulo constantes, teria sido mais difícil.

A psicóloga Rita Torres Dinis, que com “nossas conversas” e com suas sugestões tem tornado muito mais fácil para eu lidar com meus problemas, reconhecer meus limites e conduzir minha vida de forma mais organizada e produtiva. Devo a você a conclusão deste trabalho. Devo, ainda, o início de uma nova vida, cheia de esperança e de expectativas! Obrigada!

A você, que sabe bem quem é. Obrigada, por me mostrar a vida. O que é coragem, por me dar as forças necessárias para ser, viver e concluir o que comecei. Por um dia ter dito: “Somos somente nós dois: você e eu.” Isso mudou uma jornada, uma história e criou uma imensidão de possibilidades. Obrigada! O destino brinca e joga no tempo, mas um dia essa será a verdade, ou não, quem sabe? Te disse um dia, não tenho pressa... A estrada, onde nos conhecemos é longa, mas mais longa é a estrada da vida, cheia de encontros e desencontros... Não acredito em histórias que se acabam, assim sem motivos reais, acredito no destino, sei que um dia, nas estradas da vida, nos caminhos entre Jaboticabal, São Paulo... E, o Mundo, nós vamos nos reencontrar... Daí,

bem daí, a vida e o tempo dirão, o que vai ser... Não tenho pressa, na verdade tenho todo o tempo do Mundo! Obrigada, obrigada por tudo!

Aos policiais militares rodoviários C. A. Perón e C. J. S. Silva por na véspera do Natal de 2006 terem atendido a certa ocorrência, na qual, a acidentada era eu. Eles foram muito além de suas obrigações. Foram dois anjos, amigos e gentis. O primeiro se superou em gentilezas e delicadezas, mesmo, eu mal sendo capaz de falar qualquer coisa, que fizesse sentido. Já o segundo, fez com que a terrível provação da solidão, numa cidade estranha, num hospital vazio e desprovido de recursos fosse menos assustadora, com palavras de apoio e animação, me mantendo acordada durante todas as horas necessárias até que alguém de minha família chegasse. Ambos foram meus anjos da guarda naquele dia, nunca poderei agradecer devidamente. Obrigada!

A equipe de resgate da CENTROVIAS que na véspera do Natal de 2006 atendeu à mesma ocorrência que os dois policiais acima, aos paramédicos, médicos, enfermeiros, bombeiros e mecânicos, todos anônimos, mas generosos, que rapidamente me ajudaram, sem pedirem nada em troca, com palavras calorosas e gestos de carinho e esperança. A minha eterna gratidão.

A equipe do Hospital São José em Itirapina – SP, que na véspera do Natal de 2006 receberam a mim para atendimento, em especial a médica Sandra e ao enfermeiro Vicente, ela por ter sido a responsável pelo meu atendimento, e ele por ter passado horas ao meu lado, ouvindo minhas lamúrias e lamentações, sendo tranquilo e gentil o tempo todo, me dando esperanças e carinho. O meu muito obrigada.

A toda a equipe do Hospital do Coração, Associação Sírio – Libanês, em especial aos doutores Adbi Jatene e Leopoldo Pieguas, por terem trazido meu amado pai de volta para nós inteirinho, só com alguns pontinhos e um discreto pigarro. Vocês devolveram a nós nosso bem mais precioso, o centro da nossa família, nosso ponto de equilíbrio. Nunca vou poder dizer o que foram para nós os dias e as horas que antecederam a boa nova de que tudo correrá bem na cirurgia. Muito obrigada.

“A primeira e essencial qualidade da busca espiritual não é a fé, mas a coragem”.

(Mahatma Gandhi)

“Não importa onde você parou, em que momento da vida você cansou. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo, é renovar as esperanças na vida e mais importante, acreditar em você de novo. Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado. Chorou muito? Foi limpeza d’alma. Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia...”

(Carlos Drummond Andrade)

Homenagem

“... um dia descobriremos, que apesar de vivermos quase um século, esse tempo todo não é o suficiente para realizarmos todos os nossos sonhos... para dizermos tudo o que deve ser dito...”

(Mario Quintana)

A minha avó, Ruth de Mello (in memorian), com você aprendi muitas coisas, mas a lição máxima foi esta: sempre manter a cabeça erguida, não importa quão ruim as coisas pareçam desse modo tudo pode ser superado. Nesta fase, que agora encero, tive de exercer continuamente esta lição, mas graças a Deus ela havia sido muito bem aprendida, não fosse isso, não teria conseguido. Foi você quem me disse, antes mesmo, de me ensinar a balbuciar, que devemos ser fortes, guerreiras e vencedoras. Bem, não é fácil, mas, acho que consegui. Mais, uma vez obrigada! Não fosse a contínua lembrança dessa força, teria desistido, há muito...

Aos meus avós, João de Souza e Maria Z. de Souza (in memorian), vocês me deram o desejo de vencer, de seguir os passos de meu pai, que tanto orgulho deu a vocês. Onde quer que estejam sei que, hoje, se sentem orgulhosos de mim!

*“Quanto menos desejos você tem,
Mais perto está dos deuses.”*

(Sócrates)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Ana Paula de Souza – nascida aos 14 de Maio de 1974, em São Paulo, São Paulo, Brasil. Graduiu-se médica veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (FCAV-UNESP), *campus* de Jaboticabal, em Dezembro de 1998. Fez aperfeiçoamento na área de Clínica Médica, em pesquisa e atendimento clínico, junto ao Serviço de Nefrologia & Urologia, do Hospital Veterinário ‘Governador Laudo Natel’, da FCAV-UNESP, de Fevereiro de 1999 a Junho de 2000. Obteve o título de mestra em Medicina Veterinária, área de concentração Clínica Médica Veterinária em Novembro de 2002. Ingressou no programa de doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração Clínica Médica Veterinária em Março de 2003. Tanto no mestrado quanto no doutorado foi bolsista CAPES. Ambos os cursos de pós-graduação foram realizados junto ao programa de pós-graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *campus* de Jaboticabal. Participou do Grupo de Pesquisas em Nefrologia e Urologia Veterinária, do Departamento de Clínica Médica e Cirúrgica da FCAV-UNESP, de Fevereiro de 1998 a Fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

CAPÍTULO – 1 – Considerações Gerais

1 – Introdução	2
2 – Revisão de Literatura	3
2.1. – <i>A Respeito da Distrofia Muscular de Duchenne</i>	7
2.2. – <i>Sobre os Modelos Animais para o Estudo da Distrofia Muscular de Duchenne.</i>	7
2.3. – <i>O cão como modelo da DMD – A Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD).</i>	9
2.4. – <i>Considerações sobre Terapia Celular.</i>	12
2.5. – <i>A Respeito do Imunossupressor Empregado no Estudo.</i>	15
2.6. – <i>Monitoração de Paciente com Doença Crônica</i>	17
BIBLIOGRAFIA	19
	21

CAPÍTULO 2 – Função Renal e Homeostase de Água e Sódio de Cães da Raça Golden Retriever Normais, Portadores e Afetados pelo Gene da Distrofia Muscular.

	24
1 – Introdução e Revisão de Literatura.	25
2 – Material e Método.	27
<i>Comissão de Bioética.</i>	27
<i>Animais</i>	27
<i>Instalações</i>	30
<i>Alimentação</i>	30
<i>Delineamento Experimental</i>	31
COLETA DAS AMOSTRAS LABORATORIAIS	33
<i>Urinálise</i>	33
<i>Bioquímica Sérica e Urinária</i>	33
<i>Concentrações Séricas e Urinárias de Sódio e Potássio</i>	34
TESTES DE FUNÇÃO RENAL	34
<i>Clearance de Creatinina</i>	34
<i>Excreção Fracionada de Solutos</i>	34
<i>Estatística dos Resultados</i>	34
3 – Resultados.	35
4 – Discussão.	47
5 – Conclusão.	52
BIBLIOGRAFIA	53

**CAPÍTULO 3 – Função Renal e Homeostase de Água e Sódio de Cães
da Raça Golden Retreiver Submetidos à
Imunossupressão para Terapia Celular.**

	56
1 – Introdução e Revisão de Literatura.	57
2 – Material e Método	60
<i>Comissão de Bioética</i>	60
<i>Animais</i>	60
<i>Delineamento Experimental</i>	61
COLETA DAS AMOSTRAS LABORATORIAIS	64
<i>Urinálises</i>	64
<i>Bioquímica Sérica e Urinária</i>	64
TESTES DE FUNÇÃO RENAL	65
<i>Clearance de Creatinina</i>	65
<i>Excreção Fracionada de Solutos</i>	65
<i>Análise Estatística dos Resultados</i>	65
3 – Resultados.	66
4 – Discussão.	76
5 – Conclusão.	79
BIBLIOGRAFIA	80

CAPÍTULO 2 – Lista de tabelas

TABELA 1 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de cães (7 machos e 10 fêmeas) normais da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	36
TABELA 2 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 8 cadelas portadoras do gene da Distrofia Muscular do Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	36
TABELA 3 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 13 cães machos afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	37
TABELA 4 – Resultados da análise da variância e comparação das médias (Holm Sidak) de valores relativos à função renal de cães da raça Golden Retriever, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	38
TABELA 5 – Resultados da análise de variância por postos (Kruskal-Wallis) e comparação das medianas (Dunn) de valores relativos à função renal de cães da raça Golden Retriever, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	38

CAPÍTULO 3 – Lista de tabelas

TABELA 6 –	Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 7 cães machos normais da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	67
TABELA 7 –	Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 8 cães machos afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	67
TABELA 8 –	Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 4 cães machos normais, da raça Golden Retriever, submetidos a imunossupressão. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	68
TABELA 9 –	Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 4 cães machos afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever, submetidos a imunossupressão e transplante de células-tronco. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	68
TABELA 10 –	Resultados de análise de variância e comparação das médias (Holm Sidak) de valores relativos à função renal de cães da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	70
TABELA 11–	Resultados de análise de variância por postos (Kruskall-Wallis) e comparação das medianas (Dunn) de valores relativos à função renal de cães da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	71

CAPÍTULO 2 – Lista de figuras

- FIGURA 1 – Representação gráfica dos valores individuais, mais as médias $\pm$ erros padrões, da creatinina sérica, do volume urinário e do *clearance* de creatinina, dos grupos estudados; GN – animais normais (7 machos e 10 fêmeas), GP – fêmeas portadoras (8), e GA – machos afetados (13), FCAV-UNEP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007. . 40
- FIGURA 2 – Representação gráfica dos valores individuais, mais as médias $\pm$ erros padrões, da concentração sérica de sódio, da carga filtrada deste íon, da excreção fracionada do íon e do sódio excretado, dos grupos estudados; GN – animais normais (7 machos e 10 fêmeas), GP – fêmeas portadoras (8), e GA – machos afetados (13), FCAV-UNEP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007. 41
- FIGURA 3 – Representação gráfica dos valores individuais, mais as médias $\pm$ erros padrões, da concentração sérica de potássio, da carga filtrada deste íon, da excreção fracionada do íon e do potássio excretado, dos grupos estudados; GN – animais normais (7 machos e 10 fêmeas), GP – fêmeas portadoras (8), e GA – machos afetados (13), FCAV-UNEP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007. 42

CAPÍTULO 3 – Lista de figuras

- FIGURA 4- Representação gráfica dos valores individuais mais as médias $\pm$ erros padrões de creatinina sérica (mg/dL); volume urinário (μ L/min/kg); *clearance* de creatinina (mL/min/kg), para GN (machos normais), GA (machos afetados), GI (machos imunossuprimidos) e GIT (machos afetados imunossuprimidos e transplantados), FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007. 73
- FIGURA 5 - Representação gráfica dos valores individuais mais as médias $\pm$ erros padrões de sódio sérico (mEq/L), carga filtrada deste íon (mEq/min/kg), excreção fracionada de sódio (%) e sódio excretado (mEq/min/kg), para GN, GA, GI e GIT, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007. 74
- FIGURA 6 - Representação gráfica dos valores individuais mais as médias $\pm$ erros padrões de sódio sérico (mEq/L), carga filtrada deste íon (mEq/min/kg), excreção fracionada de sódio (%) e sódio excretado (mEq/min/kg), para GN, GA, GI e GIT, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007. 75

CAPÍTULO 2 – Lista de quadros

QUADRO 1 –	Discriminação da composição dos cinco grupos experimentais de acordo com o sexo e a idade dos cães que os compuseram.	29
QUADRO 2 –	Parâmetros analisados no exame químico, por avaliação semiquantitativa (fita reagente) e os escores a eles atribuídos.	31
QUADRO 3 –	Parâmetros analisados no exame do sedimento urinário e os escores a eles atribuídos.	32
QUADRO 4 -	Sumário dos parâmetros analisados, nos cães, Golden Retriever normais (GN), portadores (GP), afetados (GA) pelo gene da GRMD, imunossuprimidos (GI) e imunossuprimidos e transplantados (GIT), Jaboticabal – Dezembro de 2006.	32
QUADRO 5 -.	Resultados da análise de variância por postos (Kruskal-Wallis), dos parâmetros físico-químicos, dados em escores*, obtidos ao exame de urina de cães da raça Golden Retriever. GA - machos afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (11 amostras); GP - fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular (11 amostras); e GN – machos e fêmeas normais (13 amostras). FCAV-UNESP/FMVZ-USP, 2007.	43
QUADRO 6 -.	Resultados da análise de variância por postos (Kruskal-Wallis), dos parâmetros sedimentoscópicos, dados em escores*, obtidos ao exame de urina de cães da raça Golden Retriever. GA - machos afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (11 amostras); GP - fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular (11 amostras); e GN – machos e fêmeas normais (13 amostras). FCAV-UNESP/FMVZ-USP, 2007.	44
QUADRO 7 -	Resultados da análise estatística descritiva, dos parâmetros sedimentoscopia, dados em escores*, obtidos ao exame de urina de cães da raça Golden Retriever. GA - machos afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (11 amostras); GP - fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular (11 amostras); e GN – machos e fêmeas normais (13 amostras). FCAV-UNESP/FMVZ-USP, 2007.	45
QUADRO 8 -	Resultados da análise estatística descritiva, dos parâmetros físico-químicos, dados em escores*, obtidos ao exame de urina de cães da raça Golden Retriever. GA - machos afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (11 amostras); GP - fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular (11 amostras); e GN – machos e fêmeas normais (13 amostras). FCAV-UNESP/FMVZ-USP, 2007.	46

CAPÍTULO 2 – Lista de quadros

QUADRO 9 – Distribuição das intervenções e avaliações ao longo de 30 dias de estudo de cães da raça Golden Retriever normais (GI) e de 67 dias no caso dos afetados por Distrofia Muscular (GIT), submetidos a tratamento com Ciclosporina A, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	63
QUADRO 10 – Análise dos dados relativos às idades e pesos dos animais de cada um dos 4 grupos experimentais, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

BMD	Distrofia Muscular de Bercker
CsA	Ciclosporina A
Ccr	<i>Clearance</i> de Creatinina
CfK	Carga filtrada de potássio
CfNa	Carga filtrada de sódio
CK	Creatina quinase
DCCV	Departamento de clínica e cirurgia veterinária
DM	Distrofia Muscular
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
Ef	Excreção fracionada
EfK	Excreção fracionada de potássio
EfNa	Excreção fracionada de sódio
FCAV	Faculdade de ciências agrárias e veterinárias
FMVZ	Faculdade de medicina veterinária e zootecnia
GA	Grupo de machos afetados pela GRMD
GENOMA	Grupo de estudos do GENOMA humano
GI	Grupo de animais normais imunossuprimidos
GIT	Grupo de animais afetados pela GRMD imunossuprimidos e transplantados
GN	Grupo de animais normais
GP	Grupos de fêmeas portadoras
GPNUV	Grupo de pesquisas em nefrologia e urologia veterinária
GRMD	Distrofia Muscular do Golden Retriever
HFMD	Distrofia muscular hipertrófica felina
IB	Instituto de Biociências
KEx	Potássio excretado
LRM	Miopatia do Labrador Retriever
MDX	Camundongo C57Bl/10ScSn mdx
NaEx	Sódio excretado
Scr	Creatinina sérica
SK	Potássio sérico
SNa	Sódio sérico
TFG	Taxa de filtração glomerular
UNESP	Universidade estadual paulista
USP	Universidade de São Paulo
U-P/C	Razão proteína creatinina urinária
VCI	Departamento de cirurgia veterinária
VU	Volume urinário

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética recessiva e hereditária, ligada ao cromossomo X, caracterizada pela ausência ou insuficiência da proteína distrofina no sarcolema das fibras musculares. É uma doença muscular progressiva, que afeta um em cada 3.500 meninos. Atualmente, os cães da raça Golden Retriever, portadores da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD), que exibem mudanças musculares, patogenia, bem como o fenótipo, comparáveis aos vistos nos casos de DMD, vêm sendo considerados o melhor modelo animal para o estudo da DMD. Nos GRMDs a fraqueza muscular inicia-se a partir do segundo mês de vida e é progressiva, portanto, a expectativa de vida destes cães é muito reduzida. Histologicamente, os músculos mostram necrose, fibrose e regeneração. As manifestações patológicas da GRMD já se iniciam na vida intra-uterina com o desenvolvimento de lesões nos músculos da língua. A hipertrofia da língua está associada com disfunção da faringe e do esôfago, o que resulta em disfagia, regurgitação e sialorréia. A pesquisa com células-tronco tem um potencial para avanços significativos no nosso conhecimento da diferenciação celular com a promessa de excitantes e inovadoras aplicações terapêuticas para desordens genéticas e degenerativas incuráveis. Nessa pesquisa, os cães foram submetidos a imunossupressão, com ciclosporina A, para transplante de células tronco. Para que isso fosse viável, foram necessários maiores exames e cuidados médicos com os animais. Dentre os principais exames realizados estavam, o *clearance* de creatinina e a excreção fracionada de sódio e potássio. Este estudo concluiu que: (1) a função renal, avaliada pelos testes de função, encontra-se dentro dos valores de referência para a espécie; (2) a magnitude da proteinúria é suficiente para sugerir a existência de uma patologia nos cães GRMD; (3) que esta patologia seja relacionada a distúrbios de ultrafiltração glomerular; (4) que o tratamento com ciclosporina A pode levar a proteinúria nos animais normais; (5) os distúrbios de potássio detectados devem ser desencadeados pela distrofia muscular.

Palavras-chaves: Função renal, Golden Retriever, Distrofias Musculares.

ABSTRACT

Duchenne's Muscular Dystrophy (DMD) is a lethal childhood disease, a X-linked recessive disorder, caused by mutations of the dystrophin gene, a protein that has a vital role in maintaining muscle structure and function. DMD is a progressive muscular disease, that affects 1:3500 born boys. At this moment, the dogs with Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), is the best animal model to study DMD. GRMD dog exhibits muscle changes, pathogenesis and phenotype comparable with the DMD boys. In GRMDs the muscular weakness beginning with 60 days of life and this is progressive. Histologically, the muscles show necrosis, fibrosis, degeneration and regeneration. The pathogenesis manifests *in utero* with the development of lingual muscle lesions. The tongue hypertrophy is associated with pharyngeal and esophageal dysfunction, and results in dysphagia, regurgitation and drooling. The research with stem-cells has a great potential to significative advances in owner knowledge about cellular differentiation, with the promise of therapeutic applications in genetic disorders and in degenerative or incurable diseases. In this research the dogs are submitted to immunosuppression, with ciclosporine A to received stem-cell transplant. So their needed more careful and attention with their medical care. In this point, we employed the renal function tests: creatinine *clearance* and fractional excretion of sodium and potassium. This research conclude that: (1) the renal function is similar that the normal to the specie; (2) proteinuria is great to show a possible disorder in the kidney of GRMD dogs; (3) and, this lesion is in glomeruli; (4) the ciclosporine could be in the normal dogs to a proteinuria; (5) potassium disorders are caused for the muscular dystrophy.

Key-words: Renal function, Golden Retriever, muscular dystrophy.

**FUNÇÃO RENAL E HOMEOSTASE DE ÁGUA E SÓDIO EM CÃES DA RAÇA
GOLDEN RETRIEVER NORMAIS, PORTADORES E AFETADOS PELA
DISTROFIA MUSCULAR**

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 - INTRODUÇÃO

Os seres humanos são acometidos por cerca de trinta formas de distrofias musculares (DM) já bem descritas na literatura, assim como, outras tantas, ainda, não bem caracterizadas. Para muitas DMs existem diversos modelos animais em uso, que podem ser úteis para pesquisas esclarecedoras, tanto sobre o mecanismo do desenvolvimento da doença em si, como para a descoberta de terapias inovadoras, que possibilitem a recuperação, ou apenas a esperança de novos caminhos no futuro para os portadores de tais afecções.

Dentre as DMs, mais estudadas e caracterizadas, destaca-se a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), que foi inicialmente descrita por Duchenne em 1872. A DMD é uma doença de caráter hereditário e recessivo, ligada ao cromossomo X, com características progressivas e devastadoras. A DMD, que acomete um em cada 3500 meninos, está relacionada à deficiência ou insuficiência de uma proteína no sarcolema das fibras musculares, a distrofina.

Tal deficiência ou insuficiência na distrofina leva os pacientes da DMD a apresentarem os primeiros sinais da doença ao redor dos dois a cinco anos de idade, quando começam a se mostrar incapazes na transição do engatinhar para o caminhar. Na doença, a histologia é complexa e envolve degeneração, regeneração, necrose, hipertrofia e fibrose das fibras musculares afetadas. Os meninos têm concentrações séricas de creatina quinase (CK) altas, provavelmente, pela degeneração e necrose muscular contínua, desde o nascimento. Como características externas marcantes há hipertrofia da musculatura da panturrilha e arqueamento da musculatura das costas, que

pode envolver em cada indivíduo uma forma diferente de lesão, variando entre escoliose, lordose e cifose. Os músculos dos membros inferiores são os mais acometidos, o que leva os pacientes à cadeira de rodas, ainda, na primeira década de vida. A morte sobrevém ao redor dos vinte anos por falência dos músculos respiratórios, em especial do diafragma, ou então por falência cardíaca.

Existem inúmeros modelos para se estudar a DMD; desde a simples cultura de células, passando pelos nematóides, peixes e aves, até os camundongos, ratos, gatos e cães. Alguns destes foram modificados geneticamente para se tornarem modelos experimentais adequados e são mais eficientes, exatamente por esta característica, como é o caso dos nematóides e peixes. Estes podem se reproduzir rapidamente, formam colônias de baixo custo de manutenção e, bioquímica e geneticamente são homólogos à DMD. No entanto, são fenotipicamente diversos à DMD o que os tornam modelos experimentais precários para o estudo de terapias não farmacológicas.

O modelo animal mais empregado para o estudo das terapias modernas para o tratamento da DMD é o camundongo mdx, que é geneticamente homólogo à DMD. Trata-se de um modelo interessante por esta característica, bem como por ser o camundongo um animal tradicional de laboratório, com colônias de fácil manutenção e baixo custo. Entretanto, algumas características relacionadas ao fenótipo da doença no camundongo, assim como sua expectativa de vida curta, por vezes o tornam um modelo animal inadequado para certas terapias.

O modelo canino para a DMD é encontrado em animais da raça Golden Retriever que podem apresentar uma distrofia muscular denominada “Golden Retriever Muscular Dystrophy” (GRMD - sigla de uso internacional). A GRMD é bioquímica, genética e fenotipicamente homóloga à DMD. Os animais expressam as mesmas lesões e características que os meninos acometidos pela DMD. Têm uma expectativa de vida mais longa e, até hoje, são o melhor modelo animal para o estudo da fisiopatologia e das terapias possíveis para a DMD. Portanto, têm sido escolhidos como modelo para avaliação de terapias inovadoras, tais como a gênica viral e não viral, os transplantes de mioblastos e, de células-tronco. Entretanto, os cães de um modo geral apresentam algumas restrições como modelos experimentais. A manutenção das colônias é

cara e sempre há risco de envolvimento emocional dos pesquisadores com os animais. Os filhotes GRMD freqüentemente são natimortos, outros morrem horas ou dias após o nascimento e, os poucos que sobrevivem, requerem cuidados constantes em virtude de suas dificuldades motoras. Além dos transtornos de locomoção, os GRMD apresentam dispnéia e disfagia severa. Esta decorre da atrofia da musculatura facial e cervical envolvida na deglutição e da hipertrofia da musculatura da língua que já é percebida desde a vida intra-uterina nos animais afetados. Assim, os GRMD têm uma dificuldade dramática para alimentar-se. É marcante a dificuldade para deglutição de líquidos; os animais ingerem pouquíssima água e apresentam sialorréia continuamente. Em consequência disso, os GRMD tendem a fazer balanço negativo de água e a desidratação é inevitável.

Apesar das dificuldades descritas, algumas colônias de cães GRMD vêm sendo mantidas por grupos de pesquisadores na Europa, nos Estados Unidos da América do Norte e no Brasil. A colônia brasileira, denominada “GRMD-Brasil”, está instalada no Departamento de Cirurgia Veterinária (VCI), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), da Universidade de São Paulo (USP), sob a responsabilidade da Dr^a. Maria Angélica Miglino que partilha a manutenção e a coordenação das pesquisas com a Dr^a. Mayana Zatz coordenadora do Centro de Estudos do Genoma, do Instituto Biociências (IB), da USP. Com o decorrer dos estudos coordenados pelas citadas pesquisadoras, as equipes depararam-se com inúmeros transtornos clínicos dos cães GRMD, que traziam complicações para os experimentos voltados à terapia com células tronco. Destas necessidades surgiu a parceria com o Grupo de Pesquisas em Nefrologia e Urologia Veterinária (GPNUV), do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (DCCV), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), coordenado pela Dr^a. Marileda Bonafim Carvalho.

2 – Hipótese

Assim, detectados os problemas relacionados à desidratação e suas consequências, foi levantada a hipótese de que os rins dos GRMD poderiam não estar aptos a manter a homeostase de água e sódio.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1. – *A Respeito da Distrofia Muscular de Duchenne*

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma patologia genética recessiva e hereditária, ligada ao cromossomo X, caracterizada pela ausência ou insuficiência da proteína distrofina no sarcolema das fibras musculares. É uma doença muscular progressiva, que afeta um em cada 3.500 meninos. É considerada a mais comum dentre as distrofias musculares vinculadas ao cromossomo X (BERGMAN et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004).

SHELTON e ENGVALL (2005) descreveram a existência de trinta formas de distrofias musculares (DM) já bem caracterizadas em humanos, além de algumas, ainda, sem classificação. Portanto, a DMD é uma entre muitas das DMs a acometer os seres humanos e está sob constante estudo há décadas. A DMD foi descrita inicialmente, em 1872, por Duchenne, tendo recebido este nome em sua homenagem. Embora a doença, na maioria dos meninos, limite-se apenas aos músculos, em alguns poucos casos pode afetar o sistema nervoso central, levando ao retardamento mental. A descoberta de que o código que controla o gene que produz a mutação na proteína desencadeadora da DMD, também sintetiza produtos no cérebro, tecido muito diverso dos

músculos, ofereceu uma explicação, em potencial, para as manifestações cognitivas em alguns fenótipos da DMD (HINTON et al., 2004).

A degeneração é mais severa nos músculos respiratórios e proximais dos membros inferiores (ITO et al., 1997). Os pacientes afetados normalmente já se encontram em cadeiras de rodas aos doze anos de idade e morrem, por volta dos vinte anos, de insuficiência respiratória ou em consequência das complicações cardiovasculares. Uma forma mais branda da enfermidade é a distrofia muscular de Becker (BMD), na qual os pacientes apresentam os sinais mais tardiamente e podem chegar a idades avançadas (BERGMAN et al., 2002).

O paciente com DMD nasce clinicamente normal, embora sua concentração sérica de creatina quinase (CK) seja elevada. Os primeiros sinais da DMD observados em meninos, normalmente, entre dois e cinco anos de idade, incluem dificuldade na transição do engatinhar para o andar e para subir escadas. Há, freqüentemente, atraso no desenvolvimento motor, que inclui dificuldade para ficar em pé, andar e correr. Na seqüência, há o início de uma pseudo-hipertrofia na musculatura da panturrilha, com fraqueza dos músculos proximais das pernas e o aparecimento do sinal de Gower – que implica o uso dos braços para içar o corpo ao tentar ficar em pé. A seguir, há o acometimento da musculatura das costas e dos braços, o que culmina com o paciente em uma cadeira de rodas. A morte sobrevém ao redor dos vinte anos, por falência respiratória ou em consequência de complicações cardiovasculares. Os pacientes com BMD podem ou não apresentar esta seqüência de ocorrências, mas, de um modo geral, cerca de 90% deles sobrevivem aos vinte anos e, muitos, atingem idades avançadas (BOGDANOVICH et al., 2004).

Os músculos esqueléticos normais são compostos por fibras musculares, de tamanhos similares, distribuídas de forma eqüitativa. Os músculos de um feto com DMD são normais exceto por uma ocasional hiperconcentração eosinofílica nas fibras musculares. Após o nascimento, as características histológicas das lesões da DMD incluem necrose, degeneração, fibrose e regeneração de fibra muscular, que perde suas características de distribuição, tamanho e linearidade (BERGMAN et al., 2002).

3.2. – Sobre os Modelos Animais para o Estudo da Distrofia Muscular de Duchenne

Nem todas as formas de DM têm modelos animais para seu estudo. Entretanto, camundongos e ratos vêm sendo utilizados com muito sucesso para o estudo da maioria das DMs, em especial no que diz respeito à patogênia molecular, à manipulação gênica e ao transplante com células, tais como mioblastos e células-tronco (SHELTON; ENGVALL, 2005). Por outro lado, cães e gatos podem se revelar modelos mais interessantes clinicamente para o estudo de várias DMs, assim como podem ser importantes para avaliar novas terapias (SHELTON; ENGVALL, 2005).

COLLINS e MORGAN (2003) realizaram uma revisão sobre os modelos animais para o estudo da DMD e encontraram, entre os possíveis, alguns vertebrados como camundongos, gatos, cães, peixes e frangos, bem como, invertebrados, tais como, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*.

De acordo com, COLLINS e MORGAN (2003), formas de distrofina podem ser identificadas em muitas espécies de invertebrados, incluindo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e o ouriço do mar. O *Caenorhabditis elegans* locomove-se por contrações dos músculos longitudinais estriados, que expressam uma forma homóloga da distrofina, chamada *dys-1*. Mutações da *dys-1* resultam em hiperatividade com hipercontração e aumento da sensibilidade ao neurotransmissor acetilcolina e ao seu inibidor. As vantagens do uso de nematóides como modelos animais são claras, eles são facilmente modificados geneticamente, seus clones podem ser produzidos por partenogênese e, podem crescer em massa em microtubos, tubos ou placas, mantendo assim, grandes populações e, logo, são ideais para estudos farmacológicos (GRISONI; GIESELER; SÉGALAT, 2002).

Dentre os modelos animais não mamíferos destaca-se, uma espécie de peixe tropical, o zebrafish. Este peixe foi modificado por técnicas de engenharia genética para desenvolver deficiência de distrofina, a qual apresenta uma interessante similaridade com a distrofina mamífera. As alterações são muito similares às observadas na DMD, em especial nas fases embrionárias e larvais do peixe, nas quais, por sua transparência, as observações do sistema

locomotor são estratégicas e facilitadas (COLLINS; MORGAN, 2003; BASSET; CURRIE, 2004).

A distrofia muscular do frango com atrofia muscular (AM) foi inicialmente relatada em 1956 (ASMUNDSON; JULIAN, 1956). A desordem é transmitida por codominância através de um gene simples, AM, mas o fenótipo é modificado por outros genes (KIKUCHI et al., 1981). Os estudos de YOSHIZAWA et al. (2004) indicam que o gene AM está mapeado no cromossomo 2q do frango, e que esta região, que inclui o gene AM, é similar ao locus cromossômico 8q11-24.3 nos seres humanos.

O modelo animal da DMD, mais comumente utilizado, é o camundongo C57Bl/10ScSn mdx ou, simplesmente, mdx (NGUYEN et al., 2002; COLLINS; MORGAN, 2003). Embora o mdx seja um homólogo da DMD, tanto genética quanto bioquimicamente, ele distingue-se com relação ao fenótipo da doença, que é muito mais benigno que a deficiência apresentada pelos pacientes com DMD. No mdx há menos degeneração de fibra muscular, mais regeneração e menos fibrose em comparação ao que ocorre com os pacientes humanos com DMD (SHELTON; ENGVALL, 2005). Os camundongos mdxs vêm sendo empregados com muito sucesso na terapia gênica viral e não viral e mesmo na pesquisa de técnicas, que fazem uso de oligonucleotídeos. No entanto, tais estudos ainda encontram-se distantes da repetibilidade no ser humano, mas, futuramente, poderão mudar aspectos da vida dos afetados pela DMD (COLLINS; MORGAN, 2003).

A deficiência de distrofina nos felinos, que resulta na distrofia hipertrófica muscular felina (HFMD – sigla de uso internacional), é semelhante à doença dos mdxs. O músculo esquelético do HFMD passa por ciclos de degeneração e regeneração, mas não há o desenvolvimento de fibrose debilitante que é característica da DMD. Até mesmo o nome é sugestivo; uma das características mais marcantes do músculo do HFMD é a hipertrofia, que pode vir a ser letal se houver obstrução do esôfago, insuficiência renal ou miocardiopatia. Estes animais não são de interesse como modelos animais para o estudo da DMD, pois sua doença assemelha-se de forma limitada à DMD e, além disso, deve-se considerar toda a problemática de se manter colônias de felinos e de se trabalhar com animais assim estressados (COLLINS; MORGAN, 2003).

A HFMD é relatada muito esporadicamente, com maior incidência em gatos machos, entre três e seis meses de idade, o que sugere que seja outra deficiência de distrofina cuja hereditariedade esteja ligada ao cromossomo X. Os felinos com esta deficiência têm uma apresentação clínica única; a musculatura dos ombros e pescoço fica hipertrofiada e há aumento dramático da língua. Como sinais clínicos adicionais, podem ser citados sialorréia, intolerância ao exercício, rigidez, andar de coelho, vômito e regurgitação. Ocorrem, ainda, calcificação multifocal na língua, miocardiopatia dilatada, megaesôfago e hepatoesplenomegalia. Os achados patológicos são similares àqueles verificados e descritos para os pacientes humanos com DMD (SHELTON; ENGVALL, 2005).

No que diz respeito, ao cão como modelo animal para o estudo das DMs, vale a pena destacar os aspectos da miopatia do Labrador Retriever (LRM). Não que este seja um modelo animal para o estudo da DMD. Mas, pode vir a ser confundido com um animal com DMs por deficiência de distrofina. Na verdade, a LRM é modelo animal para o estudo da miopatia autossômica centro-nuclear humana (SHELTON; ENGVALL, 2005). Os sinais clínicos são variáveis, mas geralmente se caracterizam por fraqueza generalizada e ataxia. São afetados cães entre seis semanas e sete meses de idade, que algumas vezes apresentam andar de coelho e, em casos raros, ventroflexão do pescoço acompanhada por postura anormal. Ocorre atrofia generalizada da musculatura, mas não há sensibilidade dolorosa à palpação. Soma-se a isto, aumento moderado nas atividades séricas da CK. Os LRM gravemente afetados apresentam megaesôfago, que pode ser confirmado radiograficamente. Até o momento, as investigações dos aspectos genéticos da LRM incluíram apenas um pequeno grupo de cães esporadicamente afetados. Mas, pode-se postular que a doença é transmitida por um modelo autossômico recessivo simples de hereditariedade e, que afeta ambos os sexos, ocorrendo na mesma proporção tanto em fêmeas quanto em machos (BLEY et al., 2002).

Segundo GREEN et al (2005), uma miopatia hereditária afeta machos e fêmeas, amarelos e pretos, da raça Labrados Retriever, com menos de seis meses de idade, tendo sido descrito inicialmente KRAMER et al (1976). Análises de pedigree indicam que há um padrão de hereditabilidade recessiva (KRAMER et al, 1981), mas o entendimento dos genes envolvidos, ainda, não

foi esclarecido. É evidente, que a desordem vem se tornando incrivelmente comum (BLEY et al, 2002), uma vez que entre 1999 e 2002, 22 de 602, biópsias foram de Labradores Retrievers.

Os cães afetados são homozigotos, e apresentam atrofia e fraqueza dos músculos do pescoço, ombros e costas. Os sinais clínicos já foram descritos anteriormente. O reflexo patelar se encontra enfraquecido ou mesmo ausente. Nos cães a fraqueza é exacerbada pelo exercício, por baixas temperaturas ou pela excitação. A concentração sérica de creatina quinase pode ser normal ou estar ligeiramente acima dos padrões de normalidade para a espécie. A condição tende a se estabilizar após um ano de idade. No entanto, muitos filhotes jovens podem ser eutanasiados por confusões com outros diagnósticos, tais como, displasia do quadril, miotonia ou polineuropatia (GRENN et al, 2005).

De acordo com OGINO; WILSON (2002), a deficiência de distrofina tem sido identificada em alguns filhotes de labrador retriever, bem jovens, associada a concentrações elevadas de creatina quinase, mas, ainda assim, a doença guarda muitas similaridades com a dos brittany spaniels, um modelo estabelecido para a doença do neurônio motor humano.

As distrofias musculares são um grupo de desordens heterogêneas hereditárias, degenerativas, a maioria não inflamatória, caracterizadas por fraqueza muscular progressiva (SHELTON; ENGVALL, 2002). Nos animais de companhia as distrofias associadas com a ausência ou insuficiência de distrofina, ou proteínas associadas à distrofina como a lâminina α -2 vêm sendo reconhecidas (SHELTON, G. D., et al., 2001). A distrofia muscular por deficiência de distrofina, resulta de mutações no gene da distrofina, é mais comum e melhor estudada em cães, e é sabido que está ligada ao cromossomo "X" (SHELTON; ENGVALL, 2002).

Essa forma de DM é bem relatada em muitas raças de cães, a principal delas é o Golden Retriever (KORNEGAY, et al., 1988), além dessa raça, há outras, tais como, rottweiler, pointer alemão de pêlo curto, terrier irlandês, samoieda, schnauzer miniatura, labrador retriever, spitz japonês e pembroke welsh corgi (SHELTON; ENGVALL, 2002).

WIECZOREK; GAROSI; SHELTON (2006) relataram o primeiro caso de distrofia muscular por deficiência de distrofina em um cão da raça old english

sheepdog. Tratou-se de um macho com três meses de idade, com um histórico de evolução ao longo de três semanas, que envolvia dificuldade para comer, salivação excessiva, intolerância ao exercício moderado e um não crescimento como esperado para a raça e idade. Os irmãos da ninhada e os pais, aparentemente, não são afetados. O animal pesava 8,2kg, o exame físico confirmou sua condição física depauperada, com atrofia dos músculos temporais, paraespinais, e dos membros distais. Verificou-se marcante espessamento da língua e da região faríngea, acompanhada por intensa sialorréia. Nos exames séricos verificou-se elevação da concentração de creatina quinase. Nas biópsias musculares verificou-se ciclos de degeneração, regeneração e fibrose, com a presença de fibras necróticas. Mas, sem sinal de miopatia inflamatória. Com testes histológicos e de imunohistoquímica foi comprovada a falta da distrofina no sarcômero das fibras musculares deste paciente.

3.3. – O cão como modelo da DMD – A Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD)

Mutações espontâneas do gene da distrofina ligado ao cromossomo X têm sido identificadas em algumas raças de cães, como Golden Retriever, Rottweiler e Pointer Alemão de Pêlo Curto. No Japão está sendo criada, através da fecundação de fêmeas da raça Beagle com sêmen congelado de machos da raça Golden Retriever afetados, uma linhagem de Beagles com DM. Este trabalho visa a obter animais de menor porte e de manejo mais fácil, com redução dos custos para manutenção das colônias. Contudo, os Golden Retriever com distrofia muscular (GRMD) têm sido os mais extensivamente estudados e são, claramente, os mais bem caracterizados (COLLINS; MORGAN, 2003).

MEIER (1958) documentou o primeiro caso de DM em um filhote de cão da raça Golden Retriever. Subsequentemente, a mesma DM foi identificada em inúmeros filhotes de Golden Retriever machos, ao longo dos anos, mostrando uma característica de hereditariedade da deficiência de distrofina ligada ao cromossomo X. Desde então, os cães desta raça vêm sendo empregados como modelos animais para o estudo das DMs (SHELTON; ENGVALL, 2005).

Em comparação com os diversos modelos experimentais para estudo das DMs, os cães não parecem bons em função dos custos e outros empecilhos. Suas colônias são caras para serem mantidas, os espécimes são geneticamente manipulados e, o risco de envolvimento emotivo por parte da equipe é muito grande (COLLINS; MORGAN, 2003). Além disso, muitos filhotes GRMD são natimortos e outros morrem nos primeiros dias após o nascimento, fatos que restringem a obtenção de exemplares afetados. No caso dos sobreviventes, suas dificuldades motoras exigem cuidados especiais contínuos. Portanto, quaisquer estudos que envolvam estes animais são demorados, requerem gastos consideráveis e exigem equipe numerosa e bem capacitada (NGUYEN et al., 2002).

No entanto, apenas o modelo GRMD exhibe mudanças musculares comparáveis às vistas nos casos de DMD e a patogenia, bem como o fenótipo dos cães, é semelhante à observada na espécie humana. Os cães adultos têm

massa corporal comparável a de pacientes com DMD. Por estas razões o GRMD vem sendo considerado, há alguns anos, o melhor modelo animal para o estudo da DMD (NGUYEN et al., 2002; COLLINS; MORGAN, 2003). Em função da similaridade com pacientes da DMD, os GRMD têm sido usados na busca de tratamentos definitivos para os humanos (BARTLETT et al., 2000).

Nos GRMDs, a fraqueza muscular inicia-se a partir do segundo mês de vida e é progressiva, portanto, a expectativa de vida destes cães é muito reduzida. Histologicamente, os músculos mostram necrose, fibrose e regeneração (COOPER et al., 1988; KORNEGAY et al., 1999). As manifestações patológicas da GRMD já se iniciam na vida intra-uterina com o desenvolvimento de lesões nos músculos da língua (COLLINS; MORGAN, 2003). A hipertrofia da língua está associada com disfunção da faringe e do esôfago, o que resulta em disfagia, regurgitação e sialorréia. As funções respiratórias estão alteradas e caracterizam-se por aumento na taxa respiratória de repouso e excesso do componente abdominal (NGUYEN et al., 2002; SHELTON; ENGVALL, 2005). Lesões extensas de musculatura esquelética dos membros, tronco e pescoço podem ser verificadas logo ao nascimento. Isso é mais aparente entre o 2º e o 30º dias depois do nascimento, após o quê o número de fibras musculares necróticas começa a decair (NGUYEN et al., 2002). Ao redor dos seis meses de idade, começam a ocorrer fibroses musculares severas, com predomínio da função de contração, em especial no tarso (COLLINS; MORGAN, 2003).

HOWELL et al. (1997) observaram que os cães GRMD podem morrer dentro de dias, meses ou mesmo anos. Nos animais adultos, normalmente, a causa da morte é a degeneração do músculo cardíaco. Entretanto, alguns cães afetados podem viver por seis anos ou mais. Alguns animais morrem da forma fulminante neonatal da doença dentro de poucos dias de nascimento. Nestes casos, faixas pálidas podem ser vistas nos músculos. Isto é causado pelas lesões de calcificação e necrose e é, particularmente, evidente no diafragma.

Em estudos feitos em cães, VALENTINE et al. (1990) verificaram alterações bioquímicas além dos aumentos freqüentes nas concentrações séricas de creatina quinase. Foram encontradas elevações nas concentrações séricas da alaninaminotransferase (ALT) e da aspartatotranferase, particularmente, nos animais com idades superiores a quatro semanas.

Entretanto, as análises estruturais do tecido hepático não revelaram alterações degenerativas hepáticas. Estes achados levaram os autores a concluir os aumentos da atividade plasmática de ALT foram devidas às degenerações de musculatura esquelética.

As fêmeas portadoras do gene da deficiência da distrofina, que caracteriza a GRMD, normalmente, não apresentam sinais clínicos da doença, embora suas concentrações séricas de CK, frequentemente, estejam elevadas. Ocasionalmente, a fêmea portadora manifesta miopatia clínica com lesões histológicas comparáveis. As variações do fenótipo, dentre as portadoras, refletem o processo de inativação dos cromossomos X mutantes ou normais (SHELTON; ENGVALL, 2005).

Embora muitos dos fatores que levam à desordem característica da DMD permaneçam obscuros, tem sido especulado um possível papel da distrofina na manutenção da estabilidade de membrana da miofibra durante a contração. Assim, a deficiência de distrofina nos músculos poderia torná-los mais susceptíveis às lesões induzidas pelas contrações. Esta hipótese é sustentada pela observação de que nas miopatias humanas os músculos proximais estão envolvidos nas contrações para extensão (contrações excêntricas) em proporção muito maior do que os músculos distais. Contrações para extensão ocorrem quando os músculos ativos estão estendidos, como quando é dado um passo. As pesquisas com modelos animais têm mostrado que os músculos normais são mais lesados após contrações para extensão do que após contrações para flexão. Um ciclo vicioso de fraqueza, estiramento, lesão, e depois fraqueza, podem explicar as observações do envolvimento seletivo dos músculos distróficos na contração excêntrica (CHILDERS et al., 2002). Essas características da DMD são bem observadas nos GRMD e nos mdx (COLLINS; MORGAN, 2003). Assim como os pacientes DMD, os jovens GRMD, freqüentemente, morrem por insuficiência cardíaca ou respiratória, embora muitos sobrevivam por alguns anos (NGUYEN et al., 2002; COLLINS e MORGAN, 2003).

3.4. – Considerações sobre a Terapia Celular

A questão da plasticidade das células-tronco tem sido amplamente discutida. WATT (2003) considera que os estudos desenvolvidos ao longo das últimas décadas têm-nos provido maior entendimento das células ancestrais, isto é, como a classe principal de células do corpo é gerada. Até recentemente assumia-se que nos mamíferos, as células-tronco adultas progrediam, ao longo da via de diferenciação, em uma única direção. As células-tronco totipotentes, pluripotentes ou multipotentes, passariam por diferenciação e, uma vez comprometidas com uma linhagem somática, não mais diferenciariam-se em células de outra linhagem somática embrionária. Apesar de que a maioria das células é diferenciada na vida adulta, células-tronco “auto-renovantes” também são mantidas em muitos, se não todos, tecidos. Tais células-tronco adultas se prestam a muitas funções. Quando é necessária a reposição constante de células maduras (ex. sangue e pele), ou então, quando é necessária a reposição de células diferenciadas em tecidos lesados, as células-tronco terão papel ativo. Considerando a plasticidade celular para a renovação ou mesmo repopulação tecidual, os estudos sobre transplantes de células, têm sido focos de interesse.

De acordo com o observado na DMD, a falta de distrofina causa desestabilização do complexo protéico associado ao sarcolema. Estratégias terapêuticas gênicas e celulares almejam restaurar a associação distrofina-complexo protéico. RADOJEVIC et al. (2002), a partir de fusão de culturas de mioblastos normais e de mioblastos distrofina-deficientes, obtiveram miotubos híbridos capazes de expressar e responder funcionalmente à distrofina. Os autores concluíram que, mioblastos com gene normal da distrofina podem restaurar a expressão da distrofina em mioblastos distrofina-deficientes, tanto em células de felinos como de humanos.

Segundo NOWAK e DAVIES (2004), considerando os estudos com terapia celular para os casos de DMD, os transplantes de células-tronco parecem ser mais promissores do que o de mioblastos. Isto, provavelmente, decorre do fato de que as células-tronco são muito mais prolíferas quando

transplantadas. Segundo PENG e HUARD (2004), a migração das células-tronco através do sistema circulatório após uma aplicação intra-arterial é muito mais efetiva que a dos mioblastos com relação à regeneração muscular e à expressão de distrofina após a implantação. TORRENTE et al. (2001) relataram que após aplicação de células-tronco derivadas de músculos em membros de mdx, estas migraram para a circulação e houve subsequente co-expressão de distrofina em todos os músculos.

Como relatado por GUSSONI et al. (1999), aplicações intravenosas de quaisquer tipos de células-tronco da linhagem hematopoiética normal ou de populações de células-tronco derivadas da musculatura em mdx, resultaram em reconstrução do compartimento hematopoiético nos transplantados e a restauração parcial da expressão da distrofia nos músculos afetados. Tais eventos sugerem que transplantes de diferentes populações de células-tronco podem resultar em tratamentos novos para a DMD e outras afecções.

Estudos de DESAWA et. al. (2005) com células provenientes do estroma da medula óssea, mostraram que estas têm potencial grande como agentes na terapia celular. Estas são indutoras do crescimento de linhagens de células musculares em ratos e seres humanos, com eficiência de até 89% na diferenciação celular para fibras musculares quando transplantadas.

3.5. – A Respeito do Imunossupressor Empregado no Estudo

A ciclosporina, uma gordura solúvel derivada dos fungos *Tolypocladium inflatum gams* e, *Beauveria nivea*, apresenta-se sob a forma de polipeptídio cíclico composto por 11 aminoácidos com ação imunossupressora importante. Devido às diferenças estruturais dos peptídeos que formam as suas moléculas, a ciclosporina é classificada em tipos A, C, D e G (LIN-WANG; MANRIQUE, 2002). Trata-se de um macrolídeo imunossupressor com capacidade de ligar-se a uma proteína intracelular, a ciclofilina. Sua ação imunossupressora é dada primariamente pela habilidade do complexo ciclosporina/ciclofilina em inibir o sinal da via de transdução da fosfatase calcineurina e, desse modo, suprimindo a expressão de várias citoquinas incluindo a interleucina-2. O resultado é uma inibição específica da função das células-T (ARMSTRONG, 2002; HAMEL et al., 2004). A ciclosporina A (CsA) foi introduzida, em 1978, para o tratamento em casos de transplantes alogênicos. A Csa possui como vantagem nefrotoxicidade baixa e, ao contrário dos corticosteróides e das azatioprinas, não causa mielossupressão quando empregada em doses terapêuticas (LIN-WANG; MANRIQUE, 2002; HAMEL et al., 2004).

Segundo HAMEL et al. (2004) a CsA é predominantemente absorvida no intestino delgado após ingestão. E, mesmo com os progressos recentes das formulações novas, a tolerância aos protocolos de CsA é, ainda, caracterizada por sérias reações adversas, especialmente, relacionadas à nefrotoxicidade, neurotoxicidade e hipertensão, se forem usadas doses altas. No entanto, otimizações nas dosagens da CsA são necessárias para que sejam alcançadas e mantidas concentrações séricas efetivas, as quais podem estar muito próximas dos valores tóxicos.

O metabolismo da CsA ocorre de forma extensiva no fígado e, sua meia vida no plasma é de quinze horas. A excreção é, predominantemente, biliar e em menor extensão urinária. Após administração oral do fármaco, cerca de 35%, da dose total, são absorvidos. O pico plasmático de concentração ocorre após quatro horas. No sangue, 50% da Csa são encontrados nos

eritrócitos, de 10 a 20% nos leucócitos e, o restante, permanece livre no plasma (LATIMER et. al., 1986).

KYLES et al. (2003) relataram que os sinais adversos mais observados em cães que passaram por transplante renal e foram imunossuprimidos pela CsA, foram anorexia e diarreia que podem ser amenizadas pela redução da dose do fármaco. Os problemas adversos, também, podem ser controlados com emprego de fármacos como o misoprostol e metoclopramida, ambos têm ação pró-cinética (KYLES et al., 2003).

Vários estudos foram desenvolvidos para elucidação dos mecanismos pelos quais a CsA causa lesão renal. Em humanos, muitos achados específicos – fibrose intersticial, tubulopatia tóxica, congestão dos capilares peritubulares e doenças arteriolares – estão associados ao uso da CsA (REMUZZI; BERTANI, 1989; BOWERS, 1991). Para os casos de nefrotoxicidade, foram descritas as síndromes de (1) redução aguda e reversível da taxa de filtração glomerular, (2) doença aguda microvascular, com padrão de microangiopatia trombótica e (3) dano renal crônico irreversível (REMUZZI; BERTANI, 1989).

3.6. – *Monitoração de Paciente com Doença Crônica*

De acordo com GLASZIOU, IRWING e MANT (2005) o monitoramento de pacientes que apresentam uma doença crônica deve ser delineado com cuidado e atenção, abordando os principais aspectos da doença, mas sem ignorar os demais. Assim, para estes autores, o monitoramento dos doentes crônicos teria dois aspectos fundamentais: análise e ação. Há requerimentos óbvios para que a monitorização seja realizada corretamente. É necessário ser claro quanto às observações que se quer realizar; estas devem refletir características importantes dos sistemas de variação relativos aos objetivos da monitorização, e devem ser feitas com frequência e acurácia suficientes para capturarem mudanças importantes. A análise das observações define as mudanças necessárias, num sistema de retorno, que cria um estado desejável, ou aumenta as mudanças para uma situação favorável ao paciente. As ações possibilitam que estas mudanças ocorram (COLEMAN; FERNER; EVANS, 2006).

Considerando cães GRMD, além dos distúrbios inerentes à própria distrofia muscular, a dificuldade para ingestão de alimentos, água e saliva constitui um agravante. Os animais desidratam-se rapidamente se houver qualquer falha nos cuidados ou se as condições ambientais forem desfavoráveis. Estas alterações podem resultar em diminuição da volemia e prejuízo da perfusão dos órgãos incluindo os rins. Nos casos em que os animais são submetidos a terapias imunossupressoras, os efeitos colaterais envolvem, dentre outros, distúrbios gastroentéricos que culminam com perda de água e eletrólitos. Nestas circunstâncias, o monitoramento das funções renais é imperativo devendo ser incluído no protocolo de cuidados médicos.

Como descrito por FINCO (1995), a análise da urina é necessária para diagnosticar alterações no trato urinário. A avaliação mais precisa da função renal é feita pela combinação exames bioquímicos do soro, urinálise e outras provas de função renal.

A filtração glomerular é o evento inicial no processo de formação de urina. A creatinina é formada a partir da degradação lenta e constante da fosfocreatina, resultando em uma produção diária relativamente constante que

deverá ser excretada pelos rins. Uma vez que, a principal via de excreção da creatinina em indivíduos saudáveis é renal. A creatinina produzida é filtrada livremente pelos glomérulos não sendo reabsorvida nem significativamente secretada pelos túbulos renais. Isto faz com que a quantidade de creatinina na urina seja proporcional à sua concentração sérica (FINCO, 1995).

Em cães, as mensurações do *clearance* de creatinina endógena têm sido realizadas com os mesmos períodos de coletas testados para humanos (FINCO, 1971). A coleta de 24 horas é forma tradicionalmente usada, visando reduzir os erros em consequência da urina residual e da variabilidade biológica observada em períodos curtos. Porém, ela apresenta a desvantagem de requerer o uso de gaiola metabólica, por longo período de execução, além da utilização de uma única amostra de soro, desconsiderando as possíveis variações na creatinina sérica (DIBARTOLA et al., 1980). O método executado em coletas de 20 minutos (em duplica) é empregado por muitos pesquisadores por ser uma ferramenta útil para uso clínico. Este procedimento permite avaliar a função glomerular e, simultaneamente, podem ser coletados dados e materiais para análise de funções tubulares (FINCO, 1995).

BIBLIOGRAFIA

- ARMSTRONG, V. W. Principles and practice of monitoring immunosuppressive drugs. **Journal of Laboratory Medicine**. v. 26, n. 1/2, p. 27 – 36, 2002.
- ASMUNDSON, V. S. e JULIAN, L. M. inherited muscle abnormality in the domestic fowl. **Journal of Heredity**. v. 47, p. 248 – 52, 1956.
- BARTLETT, R. J. et al. *In vivo* Targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric rna/dna oligonucleotide. **Nature Biotechnology**. v.18, p. 615-22, 2000.
- BASSET, D. e CURRIE, P. D. Identification of a zebrafish model muscular dystrophy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 31, p. 537 – 40, 2004.
- BERGMAN, R. L. et al. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in ai Labrador retriever. **Journal of American Hospital Association**. v. 38, n. 3, may-jun, p. 213 – 19. 2002.
- BLEY, T. et al. Genetic aspects of labrador retriever myopathy. **Research in Veterinary Science**. v. 73, p. 231 – 6, 2002.
- BLEY, T., GAILLARD C., BILZERK, T., BRAUND, K. G., et al. Genetic aspects of labrador retriever myopathy. **Research in Veterinary Science**. v. 73, p. 231 – 6, 2002.
- BOGDANOVICH, S. et al. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal of Molecular Medicine**. v. 24, n. 2, p. 102 – 15, 2004.
- BOWERS, L. D. Therapeutic monitoring for cyclosporine: difficulties in establishing a therapeutic window. **Clinical Biochemistry**. V.24, p. 81-7, 1991.
- CHILDERS, M. K., et al., Eccentric contraction injury in dystrophic canine muscle. **Archives of Physiology Medical Rehabilitation**. v. 83, p. 1572 – 8, 2002.
- COLLINS, C.A. e MORGAN, J.E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigated pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165 – 72, 2003.
- COOPER, B. J. et al. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**. V.334, p. 154-6, 1988.

- COLEMAN, J. J., FERNER, R. E., EVANS, S. J. Monitoring for adverse drug reactions. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 61, n. 4, p. 371 – 8, 2006.
- DESAWA, M. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. **Science**. v. 309, p. 314 – 7, 2005.
- DIBARTOLA, S.P. Urinary protein excretion and imunopathologic findings in dogs with glomerular disease. **Journal American Veterinary Medicine Association**. v. 15, n. 1, p. 73 – 7, 1980.
- FINCO, D.R. Applied physiology of the kidney. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. In: **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1st ed., p. 29 – 46, 1995.
- GLASZIOU, P., IRWING, L., MANT, D., Monitoring in chronic disease: A rational approach. **Britannic Medical Journal**. v. 330, p. 644 – 8, 2005.
- GREEN, S.L., TOLWANI, R.J., VARNA, S., SHELTON, G.D. Absence of mutations in the survival motor neuron cDNA from Labrador retrievers with an inherited myopathy. **Veterinary Record**. v. 157, p. 250 – 4, 2005.
- GRISONI, K., GIESELER, K. e SÉGALAT, L. Dystrobrevin requires a dystrophin-binding domain to function in *Caenorhabditis elegans*. **European Journal Biochemical**. v. 269, p. 1607 – 12, 2002.
- GUSSONI, E. et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. **Nature**. v. 401, p. 390 – 4, 1999.
- HAMEL, A. R. et. al. Cyclosporin A prodrugs: Design, synthesis and biophysical properties. **Journal of Peptide Research**. v. 63, p. 147 – 54, 2004.
- HINTON, V. J. et al. Investigation of poor academia achievement in children with Duchenne muscular dystrophy. **Learning Disabilities Research & Practice**. v. 19, n. 3, p. 146 – 54, 2004.
- HOWELL, J. McC. Et al., Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorders**, v. 7, p. 325 – 8, 1997.
- ITO, H. et al. Myoblast transplantation in non-dystrophic dog. **Neuromuscular Disorders** n.8, 1997, p.95-110.
- KRAMER, J. W., HEGREBERG, G. A., BRYAN, G. M., MEYERS, K.; OTT, R. L. A muscle disorder of labrador retriever characterized by deficiency of type II

muscle fibres. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 169, p. 817 - 20, 1976.

KRAMER, J.W., HEGREBERG, G. A.; HAMILTON, M.J. Inheritance of neuromuscular disorder of a labrador retriever dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 179, p. 380 – 1, 1981.

KIKUCHI, T. et al. Genetic het-crozygous carriers hereditary muscular dystrophy of chickens. **Tohoku Journal of Agricultural Research.** v. 32, p. 14 – 26, 1981.

KORNEGAY, J. N.; TULER, S. M.; MILLER, D. M.; LEVESQUE, D. C. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. **Muscle and Nerve.** v. 11, p. 1056 – 64, 1988.

KORNEGAY, J. N. et al. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with Golden Retriever muscular dystrophy. **Journal of Neurological Sciences.** v. 166, p. 115 – 21, 1999.

KYLES, A. E., et. al. Immunosuppression with a combination of the leflunomide analog, FL778, and microemulsified cyclosporine for renal transplantation in mongrel dogs. **Transplantation.** v. 75, n. 8, p. 1128 – 33, 2003.

LATIMER, K. S. Effects of cyclosporine A administration in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v. 11, p. 161 – 73, 1986.

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

MEIER, H. Myopathies in the dog. **Cornell Veterinary.** v. 48, p. 313 – 30, 1958.

NGUYEN, F. *et al.* Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. **Journal Compendium of Pathology.** 2002 V.126 , n.2-3, p.100-8.

NOWAK, K. J. e DAVIES, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. **European Molecular Biology Organization.** v. 5, n. 9, p. 872 – 6, 2004.

OGINO, S.; WILSON, R. B. Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy. **Human Genetics.** v. 111, p. 477 – 500, 2002.

PENG, H. e HUARD, J. Muscle – derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. **Transplant Immunology.** v. 12, p. 311 – 9, 2004.

- RADOJEVIC, V. et al., Restoration of dystrophin expression in culture hybrid myotubes. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. v. 28, p. 397 – 409, 2002.
- REMUZZI, G. e BERTANI, T. Renal vascular and thrombotic effects of cyclosporine. **American Journal of Kidney Disease**. V.13, n.4, p. 261-72, 1989.
- SHELTON, G. D., et al. Muscular dystrophy in female dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 15, p. 240 – 4, 2001.
- SHELTON, G. D. e ENGVALL, E. Muscular dystrophies and others miopathies. In: **Neuromuscular Diseases. North America: Small Animal Practice**. 1st edn. Ed. G. D. Shelton. Philadelphia, W. B. Saunders, p. 103 – 24, 2002.
- SHELTON, G. D. e ENGVALL, E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. **Neuromuscular Disorders**. v. 15, p. 127 – 38, 2005.
- TORRENTE, Y. et al. Intra-arterial injection of muscle-derived CD-34⁺Sca-1⁺ stem cells restores dystrophin in *mdx* mice. **Journal of Cellular Biology**. v. 152, p. 335 – 48, 2001.
- VALENTINE, B. et al. Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.4, p. 140 – 3, 1990.
- WATT, S. M. Stem cell plasticity. **British Journal of Haematology**. v. 122, p. 877 – 91, 2003.
- WIECZOREK, L. S.; GAROSI, L. S.; SHELTON, G. D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in an old english sheepdog. **The Veterinary Record**. v. 158, p. 270 – 3, 2006.
- YOSHIZAWA, K. et al., Fine mapping of the muscular dystrophy (AM) gene on chicken chromosome 2q. **International Society for Animal Genetics, Animal Genetics**. v. 35, p. 397 – 400, 2004.

CAPÍTULO 2

**FUNÇÃO RENAL E HOMEOSTASE DE ÁGUA, SÓDIO E
POTÁSSIO DE CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER
NORMAIS, PORTADORES E AFETADOS POR DISTROFIA
MUSCULAR**

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Dentre os cães da raça Golden Retriever houve mutação espontânea do gene da distrofina ligado ao cromossomo x que resultou no aparecimento de um tipo de distrofia muscular hereditária. O primeiro caso foi documentado por MEIER em 1958. A doença passou a ser conhecida como Distrofia Muscular do Golden Retriever (BARTLETT et al., 2000; NGUYEN et al., 2002; SHELTON; ENGVALL, 2005).

As manifestações patológicas da GRMD já se iniciam na vida intra-uterina (COLLINS; MORGAN, 2003) e lesões extensas da musculatura esquelética dos membros, tronco e pescoço podem ser verificadas logo ao nascimento (NGUYEN et al., 2002). A partir do segundo mês de vida há manifestação clínica de fraqueza muscular progressiva (SHELTON; ENGVALL, 2005). E, por volta dos seis meses de idade, começam a ocorrer fibroses musculares severas e predomínio do estado de contração (COLLINS; MORGAN, 2003). Histologicamente, os músculos mostram necrose, fibrose e regeneração (COOPER et al., 1988; KORNEGAY et al., 1999). Dentre as alterações musculares destacam-se a hipertrofia da língua e disfunção da faringe e do esôfago, que resultam em disfagia, regurgitação e sialorréia (NGUYEN et al., 2002; SHELTON; ENGVALL, 2005).

Em função da semelhança entre a Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD) e a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) que acomete seres humanos, os cães GRMD têm sido considerados um excelente modelo

experimental (COLLINS; MORGAN, 2003). Uma das linhas de pesquisa está relacionada aos ensaios terapêuticos. Neste quesito, os tratamentos com imunossupressores são empregados por seu efeito direto ou como parte de protocolos para dar suporte aos transplantes celulares. A ciclosporina A (CsA) é um imunossupressor indicado e, segundo HAMEL *et al.* (2004), embora existam formulações novas, as reações adversas podem ser muito severas. Estas incluem, dentre outros problemas, a nefrotoxicidade se forem usadas doses altas. Em estudo feito por MORINI (2005), foi observado que cães Golden Retriever normais ou afetados pela GRMD, respondem de maneira muito variada quando tratados com CsA. Para obtenção de concentrações plasmáticas satisfatórias, as doses necessárias de CsA não correspondem, obrigatoriamente, ao recomendado na literatura. Doses baixas podem resultar em concentrações plasmáticas excessivas e doses altas, algumas vezes, não estão associadas com concentrações plasmáticas suficientes.

2 – Hipótese e objetivo

A literatura consultada não faz referência específica aos aspectos da função renal de cães da raça Golden Retriever saudáveis e nem mesmo dos GRMD. Dentre os dados existentes, há informações suficientes para suportar a hipótese de que estes animais, em função do quadro clínico da distrofia muscular *per se*, podem experimentar alterações da função renal. Assim, o escopo do presente estudo foi avaliar alguns parâmetros da função renal de cães Golden Retriever, incluindo exemplares saudáveis, fêmeas portadoras, e machos afetados pelo gene da GRMD, por meio de exames de interesse clínico (hemograma, urinálise, creatinina sérica e urinária, uréia sérica, proteínas totais do soro, proteínas urinárias, sódio sérico e urinário, potássio sérico e urinário, *clearance* de creatinina, excreções fracionadas de sódio e potássio, razão proteína:creatinina urinária e outra gama de exames simples e, claramente executáveis), e exequíveis em centros de pesquisa destinados ao estudo da distrofia muscular.

Deste modo, este estudo teve por objetivo avaliar a função renal de cães da raça Golden Retriever normais para estabelecimento de valores de referência e analisar os mesmos parâmetros em cães da colônia GRMD-Brasil, especificamente as fêmeas portadoras e os machos afetados.

3 - MATERIAL E MÉTODO

COMISSÃO DE BIOÉTICA

Todo este projeto de estudo foi submetido à avaliação criteriosa de uma comissão de bioética¹.

ANIMAIS

Foram empregados neste estudo 35 cães da raça Golden Retriever, normais (n=17), portadores (n=10) ou afetados pela distrofia muscular (n=8), machos e fêmeas. A média da idade do grupo de animais normais foi de $19,5 \pm 4,8$ meses, sendo a média de seu peso corporal de $21,3 \pm 2,5$ kg. No grupo de fêmeas portadoras encontrou-se uma média de idades de $29,0 \pm 7,5$ meses e, uma média de peso corporal em quilogramas de $25,1 \pm 1,4$. Para os machos afetados a média de idade foi de $9,4 \pm 3,1$ meses e, o peso corporal foi em média de $14,5 \pm 2,4$ kg.

Os animais foram distribuídos nos grupos de normais, portadoras e afetados pela DM, após a realização de um exame de genotipagem, através da extração de DNA genômico do sangue do cordão umbilical, realizado pelo

¹ Comissão de bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Centro de Estudos do Genoma Humano, da Universidade de São Paulo, em protocolo experimental próprio.

A seguir foram avaliados clínica e laboratorialmente, vacinados e vermifugados. A avaliação clínica constituiu-se de anamnese e exame físico completo, seguidos de exames laboratoriais que envolveram a avaliação do hemograma, urinálise, exames enzimáticos das funções hepáticas e renais, bem como dosagens das concentrações de creatina quinase e exame coproparasitológico.

Parte dos animais permaneceu alojada em boxes do canil específico para estudo da Distrofia Muscular do Golden Retriever, localizado no Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP. O canil e os animais foram mantidos pela parceria entre o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (IB-USP) e a FMVZ-USP.

Com exceção, de sete animais (seis fêmeas e um macho) pertencentes ao grupo normal, que foram selecionados de um canil de referência na criação de Golden Retrievers, na região do Município de Atibaia, Estado de São Paulo. Porém, antes de entrarem para o grupo experimental todos estes animais foram previamente avaliados em relação a seu estado de saúde, vacinação e vermifugação. Da mesma forma, as instalações em que se encontravam alojados, dieta e condições sanitárias de manejo foram, cuidadosamente, analisadas, para que atendessem às exigências do estudo.

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais. O primeiro envolveu os cães normais ($n=17$), machos ($n=7$) e fêmeas ($n=10$), e submetidos a avaliações da função renal e homeostase de água e sódio, efetuadas uma única vez. O segundo grupo foi constituído apenas por fêmeas portadoras do gene ($n=10$), que foram avaliadas uma única vez, em relação à função renal e homeostase de água e sódio. O terceiro grupo foi formado por machos afetados ($n=8$), que também tiveram avaliadas suas funções renais e a homeostase de água e sódio, em uma única oportunidade.

Os três grupos foram avaliados e acompanhados pela parceria entre o Grupo de Pesquisas em Nefrologia e Urologia Veterinárias (GPNUV) do Departamento de Clínica e Cirurgia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista Júlio de

Mesquita Filho (FCAVJ-UNESP) e a equipe do Canil GRMD-Brasil da FMVZ-USP.

No Quadro 1 temos a discriminação da composição dos três grupos experimentais, animais afetados (GA), animais normais (GN), e fêmeas portadoras do gene (GP), de acordo com o sexo, peso e idade dos animais que os compuseram.

QUADRO 1 – Discriminação da composição dos três grupos experimentais de acordo com o sexo e a idade dos cães que os compuseram.

ANIMAIS			IDADE		
Nome	Peso corporal (kg)	Sexo	GA	GP	GN
Atchim	21	♂	30 meses		
Ringo	23,5	♂	12 meses		
Peter	19,7	♂	10 meses		
Baco	16,15	♂	7 meses		
Frank	13,90	♂	5 meses		
Jonhny	7,50	♂	5 meses		
Zeus	7,20	♂	3 meses		
Hércules	6,80	♂	3 meses		
Brenda	34,10	♀		72 meses	
Hope	29,60	♀		48 meses	
Cher	20,00	♀		48 meses	
Lady	23,00	♀		48 meses	
Vicky	26,50	♀		30 meses	
Bianca	24,00	♀		12 meses	
Clara	24,20	♀		11 meses	
Gaya	-	♀		7 meses	
Kyra	21,45	♀		7 meses	
Nikita	23,50	♀		7 meses	
Panda	30,10	♂			48 meses
Califa	38,30	♂			48 meses
Grécia	29,40	♀			48 meses
Doroth	30,90	♀			48 meses
Athena	30,00	♀			48 meses
Assíria	26,00	♀			30 meses
Patthy	29,00	♀			18 meses
Silver	28,00	♂			12 meses
Malta	23,00	♀			11 meses
Sába	24,90	♀			11 meses
Mel	29,95	♀			8 meses
Moe	9,05	♂			3 meses
Gold	8,20	♂			3 meses
Pequeno	8,70	♂			3 meses
Ice	12,50	♂			3 meses
Nina	6.80	♀			3 meses
Lisa	10,00	♀			3 meses
TOTAL		♂	8	-	7
		♀	-	10	10
		Geral	8	10	17
GA = grupo de machos afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever					
GN = grupo de animais normais					
GP = grupo de fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular do Golden Retriever					

INSTALAÇÕES

Os animais estiveram alojados nos canis GRMD do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP. O canil era composto por boxes, 2/3 da área de todos os boxes eram compostos por um *solariun* e 1/3 por uma área coberta e fechada. Os animais adultos estiveram alojados individualmente, cada box continha um comedouro, bebedouro e tablado. Os animais entre três e oito meses ficavam alojados, por idade, em no máximo três animais em cada box, nos quais existiam três comedores e bebedores. As instalações acomodam, ainda, um pátio completamente calçado, para exercício dos animais e, uma piscina, na qual os cães podiam se exercitar.

ALIMENTAÇÃO

Os cães adultos e filhotes não afetados e/ou portadores eram alimentados com ração comercial seca², nos casos de inapetência ou doença, adicionalmente, os animais receberam ração comercial úmida³. Os animais afetados pela distrofia muscular eram alimentados com ração comercial seca⁴ adicionada de água e triturada. Eventualmente, ração comercial úmida⁵ era acrescentada à mistura.

Além disso, os animais afetados recebiam água na boca através de seringas, ou mesmo, com o uso de uma mangueira, eventualmente, conseguia-se, que se alimentassem de uma mistura de água, caldo de carne, frango ou legumes e gelatina incolor, ingerindo, deste modo uma maior quantidade de água. Pois, desde o início, verificou-se que este era um dos problemas com relação aos animais afetados, o consumo de água, uma vez que a hipertrofia do músculo da língua, leva a dificuldades na deglutição e disfagia, assim como a atrofia dos músculos mastigatórios e da deglutição, praticamente impossibilitavam a ingestão de água em quantidades suficientes para manter a hidratação dos animais.

² Pedigree carne & vegetais e Pedigree Júnior – Walthan – Inglaterra.

³ Pedigree adulto e Júnior – Walthan – Inglaterra.

⁴ Hill's Prescription Diet – A/D – Colgate – Palmolive S/A – São Paulo – SP.

⁵ Hill's Prescription Diet – A/D – Colgate – Palmolive S/A – São Paulo – SP.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Num primeiro instante, os animais foram distribuídos em normais, portadores e afetados, de acordo com sua classificação genética. A seguir, os animais foram distribuídos para a formação dos grupos experimentais em: normais (GN), fêmeas portadoras (GP) e machos afetados (GA). Após o que a função renal e a homeostase de água e sódio destes cães, de acordo com o grupo ao qual pertencerem, foram avaliadas por meio de exames séricos e urinários basais (QUADRO 2).

Os quadros 3 e 4 fornecem os valores de referência para os escores empregados na avaliação das urinas, com relação aos parâmetros químicos e físicos.

QUADRO 2: Sumário dos parâmetros analisados, nos cães, Golden Retriever normais (GN), portadores (GP), afetados (GA) pelo gene da GRMD, imunossuprimidos (GI) e imunossuprimidos e transplantados (GIT), Jaboticabal – Dezembro de 2006.

Função relacionada	Parâmetro
A. Função renal (glomerular e tubular)	<i>Clearance</i> de creatinina endógena (mL/min/kg) Concentração sérica de creatinina (mg/dL) Concentração sérica de uréia (mg/dL) Excreção urinária de proteína (mg/dL) Razão proteína creatinina da urina Urinálise
B. Homeostase de Água e Sódio e função tubular renal	Excreção fracionada de sódio (%) SNa (mEq/L) U Na (mEq/L) SK (mEq/L) UK (mEq/L) Proteína total sérica (g/dL) Albumina sérica (g/dL) Osmolalidade sérica efetiva (mOsmol/L) Osmolalidade urinária efetiva (mOsmol/L)

Quadro 3 – Parâmetros analisados no exame químico da urina, por avaliação semiquantitativa (fita reagente) e os escores a eles atribuídos. Em cães sem raça definida (machos e fêmeas).

Parâmetros Analisados	Escore				
	0	1	2	3	4
Leucócitos	Negativo	10–25/μL	75/ μL	500/μL	-
Nitrito	Negativo	Positivo	-	-	-
Proteínas	Negativo	30mg/dL	100mg/dL	500mg/dL	-
Glicose	Negativo	50mg/dL	100mg/dL	300mg/dL	1000mg/dL
Corpos cetônicos	Negativo	5mg/dL	50mg/dL	150mg/dL	-
Bilirrubina	Negativo	0,5mg/dL	0,5> 6 mg/dL	6mg/dL	-
Sangue oculto	Negativo	5-10/μL	25/μL	50/μL	250/μL

Quadro 4 – Parâmetros analisados no exame do sedimento urinário e os escores a eles atribuídos. Em cães sem raça definida (machos e fêmeas).

Parâmetros Analisados	Escore						
	0	1	2	3	4	5	6
Hemácias	Negativo	<5/cmp	6-30/cmp	31-60/cmp	51-80/cmp	81-200/cmp	>200/cmp
C.Fosf.Triplo	Negativo	<5/cmp	6-30/cmp	31-50/cmp	51-80/cmp	81-200/cmp	>200/cmp
C.Amorfos	Negativo	<5/cmp	6-30/cmp	31-50/cmp	51-80/cmp	81-200/cmp	>200/cmp
C.Oxa.Cálcio	Negativo	<5/cmp	6-30/cmp	31-50/cmp	51-80/cmp	81-200/cmp	>200/cmp
Cel. Epiteliais	Negativo	<5/cmp	6-30/cmp	31-50/cmp	51-80/cmp	81-200/cmp	>200/cmp
Leucócitos	Negativo	<5/cmp	6-30/cmp	31-50/cmp	51-80/cmp	81-200/cmp	>200/cmp
Cilindros	Negativo	<5/cmp	6-30/cmp	31-50/cmp	51-80/cmp	81-200/cmp	>200/cmp
Bactérias	Negativo	<5/cmp	6-30/cmp	31-50/cmp	51-80/cmp	81-200/cmp	>200/cmp
Espermatozóides	Negativo	<5/cmp	6-30/cmp	31-50/cmp	51-80/cmp	81-200/cmp	>200/cmp

*Cmp = campo

COLETA DAS AMOSTRAS E EXAMES LABORATORIAIS

Urinálise

As amostras de urina foram coletadas por meio de micção espontânea, sempre que possível, quando isso não ocorria, o método empregado era a cateterização transuretral vesical, e os exames foram realizados imediatamente após a coleta. A densidade urinária foi determinada por meio de refratometria⁶. O pH urinário foi determinado com o emprego de um pHmetro⁷. Os demais parâmetros bioquímicos da urinálise de rotina foram mensurados por meio de tiras reagentes⁸. A sedimentoscopia foi realizada em microscópio² com aumento de 25 a 40x, após centrifugação⁹ da urina.

Bioquímicas sérica e urinária

As análises bioquímico-sélicas foram realizadas em amostras do soro obtidas após sinérese de sangue coletado por punção da veia jugular. As amostras de urina obtidas por micção espontânea foram avaliadas após centrifugação, e utilizadas para as análises bioquímicas.

Utilizando o sistema Labtest¹⁰ para diagnóstico, alíquotas das amostras de soro foram processadas para determinação de creatinina (método de Jaffé¹¹ modificado); uréia (UV-cinética – pelo método do diacetil modificado); proteína total (Biureto); albumina (Verde de Bromocresol); fosfatase alcalina (Roy modificado); cálcio (Labtest); fósforo (Daly e Ertingshausen); alaminaminotransferase (método cinético Labtest); bilirrubinas (Sins-hons) e colesterol (Labtest).

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).

⁶ Refratômetro UGI (1000-1050) ATAGO

⁷ Phmetro de bolso Q-400 BD QUIMIS

⁸ COMBUR¹⁰ TEST - Boehringer Mannheim Argentina S.A., Buenos Aires.

⁹ Centrifuga – Celm LS3 plus

¹⁰ LABTEST - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa - MG.

¹¹ Método do picrato alcalino

As leituras foram realizadas em dosador semi-automático para provas bioquímicas¹², considerando-se a faixa visível para as respectivas provas.

Concentrações séricas e urinárias de sódio e potássio

As análises foram realizadas em sistema de eletrodo de íon-seletivo¹³. As amostras de soro foram submetidas diretamente à leitura; quanto às alíquotas de urina, foi necessária centrifugação e diluição.

TESTES DE FUNÇÃO RENAL

Clearance de creatinina endógena e Excreção fracionada

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 FINCO (1995) e modificado por CARVALHO et al (1998). Para avaliação da função tubular renal, foi estudada a excreção fracionada de sódio e potássio empregando-se a técnica “spot” ou pontual descrita por FINCO (1995).

ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise estatística descritiva dos dados obtidos, assim como, a análise de variância foram feitas no Sigma Stat Analysis System, quando os dados apresentaram um comportamento, que se acomodava à uma curva de normalidade os mesmos foram avaliados pela análise de variância simples, sendo a comparação das médias entre os três grupos estudados analisada pelo método de Holm-Sidak. Já no caso, dos dados que não apresentaram curva de normalidade, a avaliação escolhida foi à análise de variância por postos ou método de Kruskal-Wallis, a comparação das médias entre os três diferentes grupos foi feita empregando-se o método de Dunn.

¹² LABQUEST-LABTEST - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa - MG.

¹³ ISELAB - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa - MG.

4 - RESULTADOS

Na tabela 1 vê-se o resultado da análise estatística descritiva do grupo de animais normais (machos e fêmeas), na tabela 2 tem-se o resultado da análise estatística descritiva do grupo de fêmeas portadoras, e na tabela 3 verificam-se os dados da análise estatística descritiva do grupo de machos afetados. A comparação entre as três análises descritivas demonstra algumas tendências do GA com relação aos demais grupos. Ele apresenta uma concentração sérica de creatinina menor que a de GP e GN, mas um *clearance* de creatinina maior que o de ambos, assim como um volume urinário superior ao de GN e GP, sua excreção urinária de proteínas indicada pela razão proteína:creatinina urinária é maior que a dos dois outros grupos, indicando uma provável proteinúria e há, ainda, um outro dado interessante, embora sua concentração sérica do íon potássio esteja próxima dos limites inferiores do que é considerado normal para a espécie e, seja menor que a dos demais grupos, sua excreção fracionada deste íon supera em muito a de GN e GP, o que pode estar indicando algum transtorno no trabalho tubular.

Na figura 1 observa-se a representação gráfica dos valores individuais e das médias $\pm$ erros padrões; da concentração sérica de creatinina, do *clearance* de creatinina e de volume urinário. Fica evidenciado no gráfico que a creatinina sérica de GA foi tanto na média quanto individualmente inferior aos valores encontrados para os demais grupos. Ao passo que a depuração de creatinina verificada pelo *clearance* foi superior na média e em alguns indivíduos de GA com relação ao GN e ao GP, o mesmo se deu com o volume de urina e com a

excreção urinária de proteínas avaliada pela razão proteína:creatinina urinária, o que indica que os animais de GA passaram por períodos de proteinúria.

A figura 2 apresenta-se a representação gráfica dos dados individuais e médias $\pm$ erros padrões; da concentração sérica de sódio, da carga filtrada de sódio, da excreção fracionada de sódio e do sódio excretado. Com relação ao sódio a única alteração que se pode destacar em relação à figura é que o GA teve um aumento na carga filtrada de sódio o que pode estar relacionado ao aumento do volume de urina e ao aumento da taxa de filtração glomerular, indicado pelo *clearance* de creatinina, revelando um aumento na velocidade do fluxo tubular.

Já na figura 3, pode-se observar a representação gráfica dos valores individuais e médias $\pm$ erros padrões; da concentração sérica de potássio, da carga filtrada de potássio, da excreção fracionada de potássio e do potássio excretado. Nas três figuras os três grupos experimentais estão representados. Observando os gráficos pode-se verificar que embora a média da concentração sérica do íon potássio de GA esteja próxima dos limites inferiores, há indivíduos que se encontram longe disso, mas com relação à excreção fracionada do íon todo o conjunto de indivíduos, assim como a média de GA foi muito superior às encontradas para GN e GP, o mesmo se deu com o potássio excretado, o que indica uma alteração no trabalho tubular com relação a este íon, ou uma mudança mais profunda no metabolismo do íon, possivelmente relacionada às alterações musculares da DM.

TABELA 1 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de cães (7 machos e 10 fêmeas) normais da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Peso	22,05	10,32	2,50	26	6,8	38,3
Scr	1,07	0,31	0,08	1,15	0,62	1,76
VU	21,74	15,78	4,07	15,94	8,77	58,59
Sur	29,90	10,94	2,58	30,50	12,65	54,00
Ccr	2,33	0,62	0,16	2,33	1,20	3,33
U-P/C	0,18	0,11	0,03	0,36	0,15	1,35
SNa	141,82	6,67	1,62	142,00	132,00	157,00
EfNa	0,72	0,24	0,06	0,77	0,28	1,03
SK	4,65	0,90	0,23	5,10	3,30	5,50
EfK	8,57	11,65	3,01	4,61	1,03	48,74
CfNa	$328,3 \times 10^{-3}$	$87,3 \times 10^{-3}$	$22,5 \times 10^{-3}$	335×10^{-3}	173×10^{-3}	480×10^{-3}
NaEx	$2,4 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	$0,3 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$	$0,7 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$
CfK	$10,9 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	$9,9 \times 10^{-3}$	$5,5 \times 10^{-3}$	$18,3 \times 10^{-3}$
KEx	$0,8 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	$0,3 \times 10^{-3}$	$0,7 \times 10^{-3}$	$0,1 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$

Scr = concentração sérica de creatinina (mg/dL), VU = volume urinário (μ L/min/kg); Ccr = *clearance* de creatinina (mL/min/kg); concentração sérica de sódio (mEq/L); EfNa = excreção fracionada de sódio (%); SK = concentração sérica de potássio (mEq/L); EfK = excreção fracionada de potássio (%); CfNa = carga filtrada de sódio (mEq/min/kg); NaEx = sódio excretado (mEq/min/kg); CfK = carga filtrada de potássio (mEq/min/kg); KEx = potássio excretado (mEq/min/kg); U-P:C = razão proteína:creatinina urinária; Sur = uréia sérica; peso = quilogramas.

TABELA 2 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 8 cadelas portadoras do gene da Distrofia Muscular do Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Peso	25,31	4,62	1,63	23,90	20,00	34,10
Scr	1,19	0,20	0,07	1,20	0,88	1,46
Sur	39,37	13,23	4,18	38,50	22,70	68,00
VU	29,11	19,39	6,86	20,11	16,27	69,74
Ccr	2,61	0,37	0,13	2,54	2,13	3,29
U-P/C	0,17	0,15	0,05	0,09	0,05	0,48
SNa	138,63	5,07	1,79	141	132	143
EfNa	0,64	0,48	0,17	0,40	0,21	1,30
SK	3,94	0,56	0,20	4,00	3,30	5,00
EfK	7,53	6,11	2,16	5,98	1,61	18,54
CfNa	$362,3 \times 10^{-3}$	$55,7 \times 10^{-3}$	$19,7 \times 10^{-3}$	$344,5 \times 10^{-3}$	302×10^{-3}	470×10^{-3}
NaEx	$2,35 \times 10^{-3}$	$1,86 \times 10^{-3}$	$0,66 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$	$0,64 \times 10^{-3}$	$5,1 \times 10^{-3}$
CfK	$10,2 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$	$0,7 \times 10^{-3}$	$10,3 \times 10^{-3}$	7×10^{-3}	12×10^{-3}
KEx	$0,7 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-3}$	$0,2 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-3}$	$0,2 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$

Scr = concentração sérica de creatinina (mg/dL), VU = volume urinário (μ L/min/kg); Ccr = *clearance* de creatinina (mL/min/kg); concentração sérica de sódio (mEq/L); EfNa = excreção fracionada de sódio (%); SK = concentração sérica de potássio (mEq/L); EfK = excreção fracionada de potássio (%); CfNa = carga filtrada de sódio (mEq/min/kg); NaEx = sódio excretado (mEq/min/kg); CfK = carga filtrada de potássio (mEq/min/kg); KEx = potássio excretado (mEq/min/kg); U-P:C = razão proteína:creatinina urinária; Sur = uréia sérica; peso = quilogramas.

TABELA 3 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 8 cães machos afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Peso	15,42	6,24	1,73	16,15	6,80	24,00
Scr	0,72	0,15	0,04	0,75	0,5	1
Sur	34,88	7,59	2,10	33,17	23,00	50,00
VU	38,13	27,58	7,65	39,81	6,69	77,86
Ccr	3,50	0,80	0,22	3,51	1,99	4,53
U-P/C	0,53	0,44	0,14	0,36	0,15	1,35
SNa	142	4,58	1,3	143	132	150
EfNa	0,74	0,80	0,22	0,49	0,05	2,93
SK	3,89	0,79	0,22	3,40	3,30	5,40
EfK	15,46	9,68	2,69	14,64	2,17	36,84
CfNa	495,7 x10 ⁻³	107 x10 ⁻³	29,6 x10 ⁻³	504 x10 ⁻³	298 x10 ⁻³	645 x10 ⁻³
NaEx	3,7 x10 ⁻³	4,8 x10 ⁻³	1,3 x10 ⁻³	2 x10 ⁻³	0,3 x10 ⁻³	18,2 x10 ⁻³
CfK	13,7 x10 ⁻³	4,6 x10 ⁻³	1,3 x10 ⁻³	12 x10 ⁻³	9 x10 ⁻³	24 x10 ⁻³
KEx	2,1 x10 ⁻³	1,4 x10 ⁻³	0,4 x10 ⁻³	1,6 x10 ⁻³	0,4 x10 ⁻³	4,4 x10 ⁻³

Scr = concentração sérica de creatinina (mg/dL), VU = volume urinário (μL/min/kg); Ccr = *clearance* de creatinina (mL/min/kg); concentração sérica de sódio (mEq/L); EfNa = excreção fracionada de sódio (%); SK = concentração sérica de potássio (mEq/L); EfK = excreção fracionada de potássio (%); CfNa = carga filtrada de sódio (mEq/min/kg); NaEx = sódio excretado (mEq/min/kg); CfK = carga filtrada de potássio (mEq/min/kg); KEx = potássio excretado (mEq/min/kg); U-P:C = razão proteína:creatinina urinária; Sur = uréia sérica; peso = quilogramas.

Na tabela 4 pode-se observar que o *clearance* de creatinina dos machos afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever diferiu significativamente dos valores obtidos para os grupos de animais normais (machos e fêmeas) e de fêmeas portadoras, tendo sido maior que os demais.

Já na tabela 5 verifica-se que o valor da creatinina sérica dos machos afetados pela GRMD é significativamente menor que o dos demais grupos. Por outro lado, a excreção fracionada de potássio destes machos foi significativamente maior que a dos animais normais, mas não diferiu estatisticamente dos valores encontrados para as fêmeas portadoras do gene da Distrofia Muscular do Golden Retriever.

TABELA 4 – Resultados de análise de variância e comparação das médias (Holm Sidak) de valores relativos à função renal de cães da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetro	Grupos	Média ± desvio padrão	Valor de P
Uréia sérica (mg/dL)	7 ♂ e 10 ♀ normais	29,90 ± 10,94	0,084
	8 ♀ portadoras	39,37 ± 13,23	
	8 ♂ afetados	34,88 ± 7,59	
Clearance de creatinina (mL/min/kg)	7 ♂ e 10 ♀ normais	2,32 ± 0,62 ^a	0,001
	8 ♀ portadoras	2,61 ± 0,37 ^a	
	13 ♂ afetados	3,50 ± 0,79 ^b	
Excreção fracionada de sódio (%)	7 ♂ e 10 ♀ normais	0,72 ± 0,24	0,914
	8 ♀ portadoras	0,64 ± 0,48	
	8 ♂ afetados	0,74 ± 0,80	
Potássio sérico (mEq/L)	7 ♂ e 10 ♀ normais	4,65 ± 0,90 ^a	0,032
	8 ♀ portadoras	3,94 ± 0,56 ^{ab}	
	8 ♂ afetados	3,89 ± 0,79 ^b	
Carga filtrada de sódio (mEq/min/kg)	7 ♂ e 10 ♀ normais	328,26 ± 87,26 ^a	0,001
	8 ♀ portadoras	362,26 ± 55,65 ^a	
	13 ♂ afetados	495,70 ± 106,86 ^b	
Carga filtrada de potássio (mEq/min/kg)	7 ♂ e 10 ♀ normais	10,85 ± 3,87	0,080
	8 ♀ portadoras	10,24 ± 1,66	
	8 ♂ afetados	13,71 ± 4,61	

FCAV = faculdade de ciências agrárias e veterinárias; UNESP = universidade estadual paulista; FMVZ = faculdade de medicina veterinária e zootecnia; USP = universidade de São Paulo.

TABELA 5 – Resultados de análise de variância por postos (Kruskal-Wallis) e comparação das medianas (Dunn) de valores relativos à função renal de cães da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetro	Grupos	Mediana	Valor de P
Creatinina sérica (mg/dL)	7 ♂ e 10 ♀ normais	1,15 ^a	0,001
	8 ♀ portadoras	1,20 ^a	
	13 ♂ afetados	0,75 ^b	
Volume urinário (μL/min/kg)	7 ♂ e 10 ♀ normais	15,94	0,281
	8 ♀ portadoras	20,11	
	8 ♂ afetados	39,81	
Excreção fracionada de potássio (%)	7 ♂ e 10 ♀ normais	4,61 ^a	0,027
	8 ♀ portadoras	5,98 ^{ab}	
	8 ♂ afetados	14,64 ^b	
U-P/C	7 ♂ e 10 ♀ normais	0,36 ^a	0,009
	8 ♀ portadoras	0,15 ^b	
	8 ♂ afetados	0,09 ^b	
Sódio sérico (mEq/L)	7 ♂ e 10 ♀ normais	142	0,274
	8 ♀ portadoras	141	
	8 ♂ afetados	143	
Sódio excretado (mEq/min/kg)	7 ♂ e 10 ♀ normais	2,28	0,901
	8 ♀ portadoras	1,32	
	8 ♂ afetados	2,03	
Potássio excretado (mEq/min/kg)	7 ♂ e 10 ♀ normais	0,65 ^a	0,004
	8 ♀ portadoras	0,62 ^a	
	8 ♂ afetados	1,61 ^b	

FCAV = faculdade de ciências agrárias e veterinárias; UNESP = universidade estadual paulista; FMVZ = faculdade de medicina veterinária e zootecnia; USP = universidade de São Paulo.

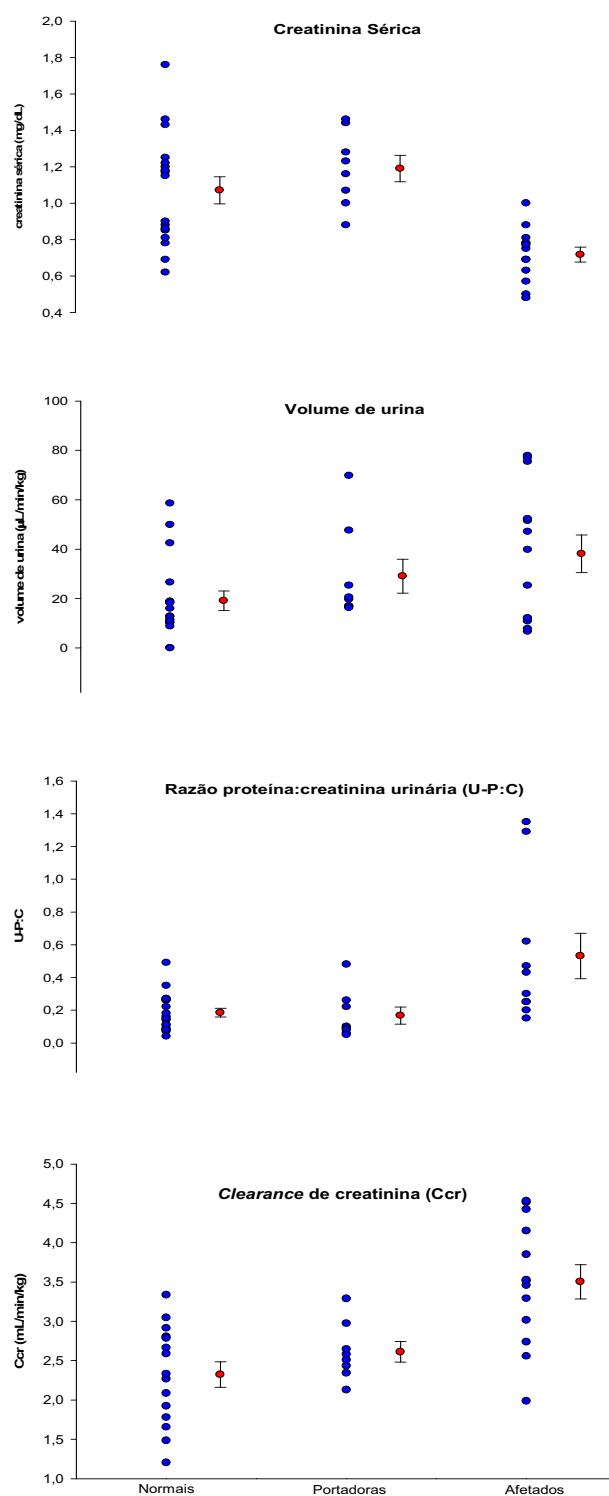


FIGURA 1 – Representação gráfica dos valores individuais, mais as médias $\pm$ erros padrões, da creatinina sérica, razão proteína:creatinina urinária (U-P/C), do volume urinário e do *clearance* de creatinina, dos grupos estudados; GN – animais normais (7 machos e 10 fêmeas), GP – fêmeas portadoras (8), e GA – machos afetados (8), FCAV-UNEP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

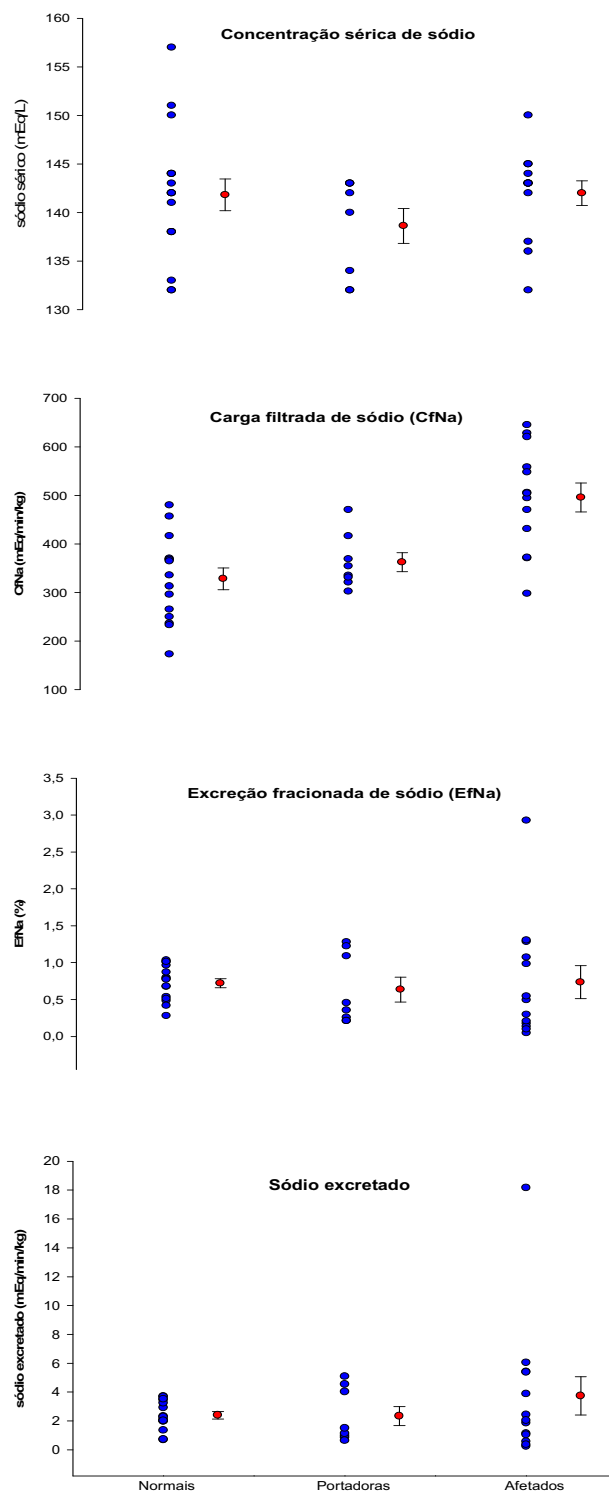


FIGURA 2 – Representação gráfica dos valores individuais, mais as médias $\pm$ erros padrões, da concentração sérica de sódio, da carga filtrada deste íon, da excreção fracionada do íon e do sódio excretado, dos grupos estudados; GN – animais normais (7 machos e 10 fêmeas), GP – fêmeas portadoras (8), e GA – machos afetados (8), FCAV-UNEP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

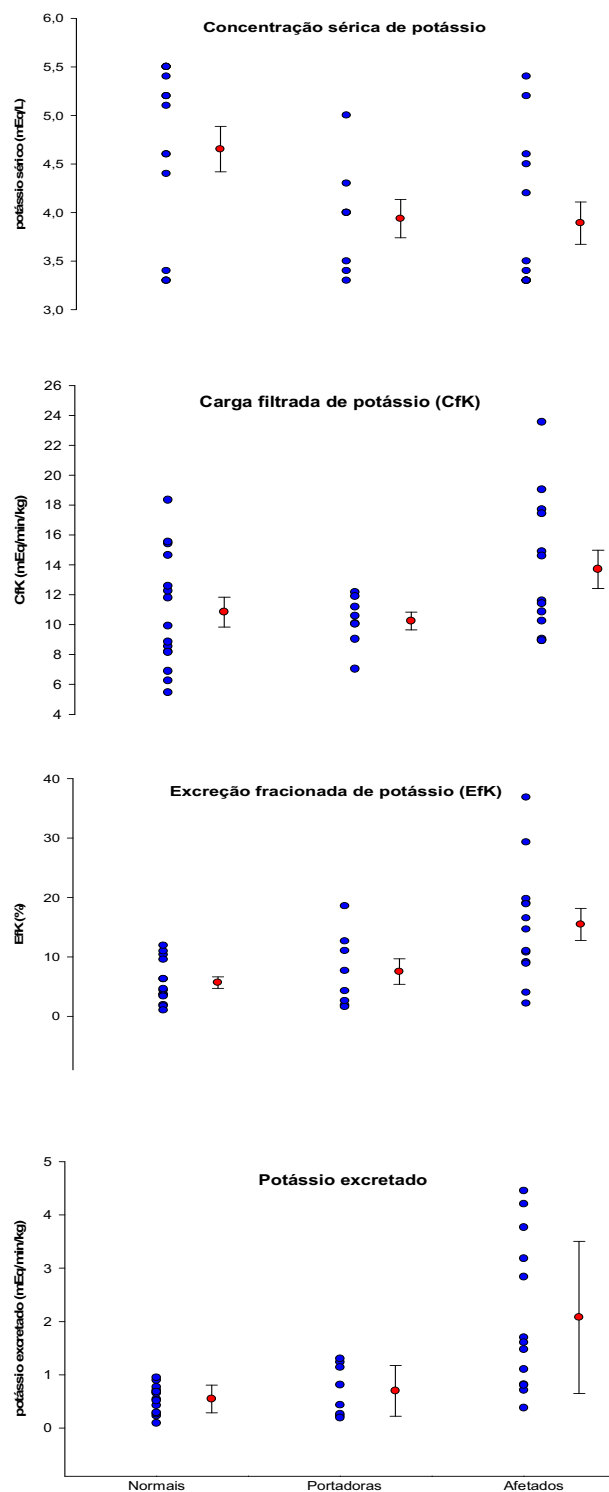


FIGURA 3 – Representação gráfica dos valores individuais, mais as médias $\pm$ erros padrões, da concentração sérica de potássio, da carga filtrada deste íon, da excreção fracionada do íon e do potássio excretado, dos grupos estudados; GN – animais normais (7 machos e 10 fêmeas), GP – fêmeas portadoras (8), e GA – machos afetados (8), FCAV-UNEP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

O quadro 5 apresenta as medianas e os valores de 'p' obtidos pela análise de variância de postos (Kruskal-Wallis), dos parâmetros físico-químicos, dados em escores, obtidos através do exame de urina dos cães dos três grupos estudados; GA (7 machos normais e 10 fêmeas normais), GP (8 fêmeas portadoras do gene GRMD), e GA (8 machos portadores do gene GRMD).

O quadro 6 demonstra as medianas e os valores de 'p' obtidos pela análise de variância de postos (Kruskal-Wallis), da sedimentoscopia, dados em escores, obtidos através do exame de urina dos cães dos três grupos estudados; GA (7 machos normais e 10 fêmeas normais), GP (8 fêmeas portadoras do gene GRMD), e GA (8 machos portadores do gene GRMD).

QUADRO 5 -. Resultados da análise de variância por postos (Kruskal-Wallis), dos parâmetros físico-químicos, dados em escores*, obtidos ao exame de urina de cães da raça Golden Retriever. GA - machos afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (8 amostras); GP - fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular (8 amostras); e GN - machos e fêmeas normais (17 amostras). FCAV-UNESP/FMVZ-USP, 2007.

Parâmetros físico-químicos	Grupos Experimentais			Teste Estatístico Kruskal-Wallis
	GA	GP	GN	
	Mediana			Valor de P
Cor	5	1	2	0,000
Odor	1	1	1	1,000
Aspecto	1	1	1	0,990
Densidade	1,041	1,019	1,022	0,046
pH fita	7,0	6,5	7,5	0,602
pH	6,7	6,45	7,85	0,296
Leucócitos	0,00	0,00	0,00	0,201
Proteína	1,00	0,00	0,00	0,012
Glicose	0,00	0,00	0,00	1,000
Corpos cetônicos	0,00	0,00	0,00	0,313
Bilirrubina	0,00	0,00	0,00	0,033
Urobilinogênio	0,00	0,00	0,00	0,336
Sangue oculto	3,00	1,00	0,00	0,002

*cor: 1 – amarelo palha; 2 – amarelo claro; 3 – amarelo citrino; 4 – amarelo ouro; 5 – amarelo escuro.

*odor: 1 – característico; 2 – alterado.

*aspecto: 1 – límpido; 2 – semi – turvo; 3 – turvo; 4 – floculado.

*leucócitos: 0 – negativo; 1 – 10 – 25/μL; 2 – 75/μL; 3 – 500/μL.

*proteína: 0 – negativo; 1 – 30mg/dL; 2 – 100mg/dL; 3 – 500mg/dL.

*escores para glicose: 0 – negativo; 1 – 50mg/dL; 2 – 100mg/dL; 300mg/dL; 4 – 1000mg/dL.

*corpos cetônicos: 0 – negativos; 1 – 5mg/dL; 2 – 50mg/dL; 3 – 150mg/dL.

*bilirrubina: 0 – negativo; 1 – 0,5mg/dL; 2 – 0,5 > 6mg/dL; 3 – 6mg/dL.

*urobilinogênio: 0 – negativo.

*sangue oculto: 0 – negativo; 1 – 5 – 10/μL; 2 – 25/μL; 3 – 50/μL; 4 – 250/μL.

QUADRO 6 -. Resultados da análise de variância por postos (Kruskal-Wallis), dos parâmetros sedimentoscópicos, dados em escores*, obtidos ao exame de urina de cães da raça Golden Retriever. GA - machos afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (8 amostras); GP - fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular (8 amostras); e GN - machos e fêmeas normais (17 amostras). FCAV-UNESP/FMVZ-USP, 2007.

Sedimentoscopia	Grupos Experimentais			Teste Estatístico Kruskal-Wallis
	GA	GP	GN	
	Mediana			Valor de P
Hemácias	1,00	1,00	1,00	0,538
crist. fosf. triplo	0,00	0,00	0,00	0,336
crist. fosf. amorfo	0,00	0,00	0,00	0,336
crist. oxal. cálcio	0,00	0,00	0,00	1,00
cel. epit. trans.	1,00	1,00	1,00	0,612
Leucócitos	1,00	1,00	0,00	0,098
Cilindros	0,00	0,00	0,00	0,131
Bactérias	0,00	0,00	0,00	0,106
espermatozóides	0,00	0,00	0,00	0,050
cel. epit. vaginal	0,00	0,00	0,00	0,363

*hemácias: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*crist. Fosf. Triplo: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

* crist. fosf. amorfo: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*crist. oxal. Calico: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*células epiteliais: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*leucócitos: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*cilindros: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*bactérias: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*espermatozóides: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*cel. Epit. vaginal: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

O quadro 7 observa-se os resultados da análise estatística descritiva da sedimentoscopia, dados em escores, obtidos através do exame de urina dos cães dos três grupos estudados; GA (7 machos normais e 10 fêmeas normais), GP (8 fêmeas portadoras do gene GRMD), e GN (8 machos portadores do gene GRMD).

O quadro 8 demonstra os resultados da análise estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos da urina, dados em escores, obtidos através do exame de urina dos cães dos três grupos estudados; GA (7 machos normais e 10 fêmeas normais), GP (8 fêmeas portadoras do gene GRMD), e GN (8 machos portadores do gene GRMD).

QUADRO - 7. Resultados da análise estatística descritiva, dos parâmetros sedimentoscopia, dados em escores*, obtidos ao exame de urina de cães da raça Golden Retriever. GA - machos afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (8 amostras); GP - fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular (8 amostras); e GN - machos e fêmeas normais (17 amostras). FCAV-UNESP/FMVZ-USP, 2007.

Parâmetros sedimentoscopia	GRUPOS								
	GA			GP			GN		
	média±s	min.	máx.	Média±s	min.	máx.	média±s	min.	máx.
Hemácias	1,5±1,6	0	6	1,3±1,4	0	3	1,0±1,0	0	3
cristais fosfato triplo	0,0±0,0	0	0	0,1±0,3	0	1	0,0±0,0	0	0
cristais fosfato amorfo	0,4±1,2	0	4	0,0±0,0	0	0	0,0±0,0	0	0
cristais oxalato de cálcio	0,0±0,0	0	0	0,0±0,0	0	0	0,0±0,0	0	0
célula epitelial transição	1,1±0,5	0	2	1,1±0,5	0	2	1,4±1,1	0	3
Leucócitos	0,7±0,5	0	1	0,7±0,4	0	1	0,3±0,5	0	1
Cilindros	0,4±0,5	0	1	0,1±0,3	0	1	0,1±0,3	0	1
Bactérias	0,0±0,0	0	0	0,2±0,4	0	1	0,0±0,0	0	0
espermatozoides	0,5±0,7	0	2	0,0±0,0	0	0	0,4±0,9	0	0
célula epitelial vaginal	0,0±0,0	0	0	0,2±0,4	0	1	0,2±0,6	0	2

*hemácias: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*crist. Fosf. Triplo: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*crist. Fosf. amorfo: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*crist. oxal. cálcio: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*células epiteliais: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*leucócitos: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*cilindros: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*bactérias: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*espermatozoides: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

*cel. epit. vaginal: 0 – negativo; 1 - <5/cmp; 2 – 6 – 30/cmp; 3 – 31 – 60/cmp; 4 – 51 – 80/cmp; 5 – 81 – 200/cmp; 6 - > 200/cmp.

QUADRO - 8. Resultados da análise estatística descritiva, dos parâmetros físico-químicos, dados em escores*, obtidos ao exame de urina de cães da raça Golden Retriever. GA - machos afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (8 amostras); GP - fêmeas portadoras do gene da distrofia muscular (8 amostras); e GN - machos e fêmeas normais (17 amostras). FCAV-UNESP/FMVZ-USP, 2007.

parâmetros físicos e químicos	GRUPOS								
	GA			GP			GN		
	média±s	min.	máx.	média±s	min.	máx.	média±s	min.	máx.
Cor	4,1±1,6	2	5	1,4±0,5	1	2	2,3±1,1	2	5
Odor	1,0±0,0	1	2	1,0±0,0	1	1	1,0±0,0	1	1
Aspecto	1,1±0,3	1	2	1,1±0,3	1	2	1,1±0,3	1	2
Densidade	1,040±0,021	1,010	1,070	1,022±0,013	1,007	1,050	1,024±0,012	1,007	1,050
pH	6,7±1,4	5	9	6,7±1,0	5	8	7,1±1,5	5	9
Leucócito	0,4±0,5	0	1	0,2±0,6	0	2	0,2±0,6	0	2
Proteína	1,4±0,7	1	3	1,0±1,0	0	3	0,5±0,5	0	1
Glicose	0,0±0,0	0	0	0,0±0,0	0	0	0,0±0,0	0	0
corpos cetônicos	0,2±0,4	0	1	0,4±1,2	0	4	0,0±0,0	0	0
Bilirrubina	0,7±1,1	0	0	0,0±0,0	0	0	0,1±0,2	0	0
Urobilinogênio	0,2±1,0	0	2	0,0±0,0	0	0	0,0±0,0	0	0
sangue oculto	2,5±1,7	0	4	1,3±1,4	0	3	0,2±0,4	0	1

* cor 1 – amarelo palha; 2 – amarelo claro; 3 – amarelo citrino; 4 – amarelo ouro; 5 – amarelo escuro.

* odor: 1 – característico; 2 – alterado.

* aspecto: 1 – límpido; 2 – semi – turvo; 3 – turvo; 4 – floculado.

* leucócitos: 0 – negativo; 1 – 10 – 25/μL; 2 – 75/μL; 3 – 500/μL.

* proteína: 0 – negativo; 1 – 30mg/dL; 2 – 100mg/dL; 3 – 500mg/dL.

* glicose: 0 – negativo; 1 – 50mg/dL; 2 – 100mg/dL; 300mg/dL; 4 – 1000mg/dL.

* corpos cetônicos: 0 – negativos; 1 – 5mg/dL; 2 – 50mg/dL; 3 – 150mg/dL.

* bilirrubina: 0 – negativo; 1 – 0,5mg/dL; 2 – 0,5 > 6mg/dL; 3 – 6mg/dL.

* urobilinogênio: 0 – negativo.

* sangue oculto: 0 – negativo; 1 – 5 – 10/μL; 2 – 25/μL; 3 – 50/μL; 4 – 250/μL.

5- Discussão

Para análise dos resultados de cães normais obtidos neste estudo, além do cotejamento com dados da literatura, também são considerados os valores de referências do GPNUV, descritos por CARNEIRO (2002) para parâmetros de função renal, e por PORTELA (2004) para os resultados de urinálise, que foram obtidos em cães mestiços, de diversos portes, sob as mesmas condições de métodos e equipamentos.

Os valores de creatinina sérica obtidos no estudo para o GN ($1,07 \pm 0,31 \text{ mg/dL}$) foram próximos àqueles descritos na literatura para a espécie canina (KANEKO, 1989; FINCO, 1995c; MEYER, et al. 1995) e ao valor de referência ($1,11 \pm 0,21 \text{ mg/dL}$). A concentração sérica de potássio ($4,65 \pm 0,90 \text{ mEq/L}$) encontrada foi muito semelhante ao valor de referência ($4,23 \pm 0,40 \text{ mEq/L}$).

Para os valores séricos de sódio do GN, a média encontrada ($141,92 \pm 6,67 \text{ mEq/L}$) foi ligeiramente superior ao valor de referência do laboratório ($138,91 \pm 5,30 \text{ mEq/L}$). No entanto, os valores se encontram dentro dos limites citados por CARLSON (1989).

Considerando os grandes avanços na metodologia diagnóstica das doenças renais na Clínica Veterinária de Pequenos Animais, os indicadores brutos da função glomerular, creatinina e uréia sérica, continuam sendo amplamente utilizados, apesar de todas as suas limitações, que podem retardar ou mesmo impedir um diagnóstico correto (BROWN, 1994). O

clearance de creatinina é claramente um método diagnóstico com mais precisão e eficiência para os casos de disfunções glomerulares e, portanto, da insuficiência renal. Nesse estudo, a média dos resultados de Ccr foi $2,32 \pm 0,62 \text{ mL/min/kg}$, que guarda semelhança bastante em relação ao valor de referência ($2,18 \pm 0,59 \text{ mL/min/kg}$).

As concentrações séricas de sódio e potássio são mantidas no organismo dentro de variações estreitas, que caracterizam a homeostase. Para tanto, grande parte do sódio e potássio filtrados pelos glomérulos é reabsorvida pelo sistema tubular, sendo a excreção de sódio, normalmente, inferior a 1% do que foi filtrado (FINCO, 1995c). A excreção de potássio atinge no máximo 20% (GRAUER, 1985). No presente estudo, a excreção fracionada de sódio dos cães normais foi de $0,72 \pm 0,24\%$ (referência do GPNUV: $0,46 \pm 0,33\%$) e a de potássio foi de $8,57 \pm 11,65\%$ (referência do GPNUV: $9,76 \pm 7,09$). As variações dos valores de excreção fracionada observáveis em um mesmo indivíduo ou quando são comparados aos de outros estudos não obrigatoriamente indicam doença renal. Os mecanismos fisiológicos regulam a excreção em função da necessidade para manutenção das concentrações séricas adequadas dos íons (FINCO; BARSANTI, 1989; LOBETTI. LAMBRECHTS, 2000; SEGURO, 2002).

O volume de urina produzida durante o período de avaliação do GN foi de $19,18 \pm 16,43 \mu\text{L/min/kg}$, enquanto a referência do GPNUV é de $12,93 \pm 8,34 \mu\text{L/min/kg}$. A comparação entre os valores evidencia que os Golden Retriever sadios podem produzir um pouco mais de urina.

A avaliação da densidade das amostras de urina do GN resultou em média de $1,024 \pm 0,012$ que foi um pouco menor que a referência do GPNUV ($1,036 \pm 0,010$). Este resultado está compatível com o achado relativo ao volume de urina. As quantidades de substâncias ou elementos figurados presentes em amostras de urina dependem não só de fatores intrínsecos aos processos de excreção e secreção, mas, também do fator concentração da urina (OSBORNE et al., 1995; McCRAW et al., 1989). Como demonstrado por PORTELLA, 2004, o método de coleta empregado (micção espontânea, cateterização transuretral ou cistocentese) também pode trazer alguma influência. A avaliação da excreção urinária de proteína, feita por meio da U-P/C, resultou no valor de $0,19 \pm 0,12$ (referência do GPNUV: $0,22 \pm 0,12$ para machos e $0,13 \pm 0,05$ para

fêmeas). Os demais parâmetros avaliados nas amostras de urina do GN mantiveram-se semelhantes ao descrito na literatura e também pelo GPNUV, para cães normais.

Ao serem comparados os resultados de todos os parâmetros analisados dos três grupos de animais deste estudo, não foram detectadas diferenças significativas entre os animais do GN e do GP. Entretanto algumas diferenças foram observadas com relação ao grupo de machos afetados.

Para o GA, o valor médio da creatinina sérica ($0,72 \pm 0,15 \text{ mg/dL}$) foi inferior aos obtidos para o GN e GP. Este achado pode ser justificado pela diferença de massa muscular, uma vez que a produção de creatinina é função direta da quantidade de fibras musculares (FINCO, 1995c). Os cães do GA pesavam $15,42 \pm 6,24 \text{ kg}$ enquanto o peso corporal do GN foi $22,05 \pm 10,32 \text{ kg}$ e o do GP foi $25,31 \pm 4,62 \text{ kg}$. As diferenças de peso corporal podem ser atribuídas à idade dos animais uma vez que no GA era de $8,78 \pm 8,48$ meses, no GP $20,90 \pm 18,86$ meses, e no GN $17,00 \pm 21,38$ meses. Outro fator relevante para haver massa muscular reduzida nos cães do GA é a própria GRMD (COLLINS; MORGAN, 2003; SHELTON; ENGVALL, 2004). Além dos fatores mencionados, a creatinina sérica dos GA pode ser mantida em concentrações menores por estar sendo depurada de maneira mais “eficiente” do que a dos demais cães, em função da taxa de filtração glomerular. O valor da média encontrado para o Ccr do GA ($3,50 \pm 0,80 \text{ mL/min/kg}$) foi maior do que os obtidos para os cães do GN e do GP ($2,33 \pm 0,62 \text{ mL/min/kg}$ e $2,61 \pm 0,37 \text{ mL/min/kg}$, respectivamente).

Embora o sódio sérico não tenha diferido entre os grupos, os cães do GA apresentaram concentração sérica de potássio ($3,89 \pm 0,79 \text{ mEq/L}$) menor do que a mensurada nos cães do GN ($4,65 \pm 0,90 \text{ mEq/L}$) sem, contudo, diferir do valor de referência do GPNUV para machos ($4,28 \pm 0,41 \text{ mEq/L}$). Este achado pode ser decorrente do fato de que os cães GRMD excretam mais potássio do que os normais ou portadores. De fato, a EfK do GA foi de $15,46 \pm 9,68\%$, valor este significativamente maior do que o observado nos cães normais ($8,57 \pm 11,65\%$). E, ainda, apesar da concentração sérica de potássio ser menor, os afetados excretaram potássio na taxa de $2,1 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-3} \text{ mEq/min/kg}$ que foi significativamente maior do que a taxa observada nos cães normais ($0,8 \times 10^{-3} \pm 1,0 \times 10^{-3} \text{ mEq/min/kg}$). A regulação da excreção de sódio nos cães do GA não diferiu da dos demais, embora a carga de sódio

filtrado tenha sido maior. O volume de urina do GA ($38,13 \pm 27,58 \mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$) não diferiu significativamente dos observados no GN ($21,74 \pm 15,78 \mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$) ou no GP ($29,11 \pm 19,39 \mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$), contudo, pode ter contribuído para aumentar a excreção de potássio. A excreção urinária de proteína, que foi avaliada por meio da U-P/C, foi mantida dentro dos valores de normalidade para os grupos GN e GP ($0,19 \pm 0,12$ e $0,17 \pm 0,15$, respectivamente), enquanto o GA teve resultado significativamente maior ($0,53 \pm 0,44$) do que os outros dois. Segundo FINCO (1995b), valores de U-P/C até 0,3 são normais para os cães, mas os que se encontram no intervalo de 0,3 a 1,0 são questionáveis já que podem ser indicativos de doença do trato urinário. Caso não haja sinal de inflamação do trato urinário inferior ou proteinúria de causa pré-renal, existirá a possibilidade de alteração glomerular. Esta situação foi à observada nos cães estudados e, assim, é plausível considerar a possibilidade de alteração glomerular.

Apesar das diferenças observadas entre os três grupos de cães estudados, não foram detectados sinais clínicos ou laboratoriais que possam confirmar a existência de doença renal nos cães GRMD. Contudo, há evidências da existência de problemas sub-clínicos.

A condição clínica verificada dos cães GRMD evidenciava, além dos sinais típicos da distrofia muscular, desidratação leve (6 a 7%). Em princípio, o desequilíbrio parece ser desencadeado pela dificuldade de deglutir decorrente da hipertrofia da musculatura da língua associada com atrofia da musculatura da face e pescoço. Os animais apresentam dificuldade para tomar água e, não sendo capazes de deglutir a saliva, perdem líquido. Apesar deste quadro, os animais tinham filtração glomerular dentro do limite de normalidade para cães e maior do que o observado para os outros da mesma raça. Em condições renais fisiológicas, a produção de urina deve diminuir se houver desidratação (FINCO, 1995c), o que não ocorreu com os GA. Embora eles tenham apresentado densidade urinária significativamente maior que a das fêmeas portadoras, o volume de urina tendeu a ser maior que o dos demais cães. Associando ao dado de volume urinário, a informação de que estes animais tinham aumento da excreção urinária de potássio mesmo tendo as concentrações séricas deste íon próxima dos limites inferiores do intervalo de normalidade, sugere perda por aumento do fluxo tubular renal. Este, por sua vez, pode ser consequência da taxa de filtração glomerular se não houver lesão túbulo-intersticial.

Adicionalmente foi detectado aumento da excreção urinária de proteína, sem a existência de sinais típicos de doença renal. Este conjunto de dados permite levantar a hipótese de que os cães afetados pela distrofia muscular tenham aumento da pressão capilar glomerular. Neste caso, haveria hiperfiltração desencadeada por glomerulopatia por lesão mínima (BROWN, 1995) ou pela redução do número de glomérulos funcionantes em decorrência de doença assemelhada à displasia renal ou à doença glomerular hereditária do cão samoieda (FINCO, 1995d). Exames histopatológicos dos rins poderiam ser conclusivos para esta questão.

6 – Conclusões

Guardados os métodos e o protocolo experimental do presente estudo, pode ser concluído o que se segue, para cães com Distrofia Muscular do Golden Retriever.

1. A função renal, descrita pelas concentrações séricas de creatinina e uréia, *clearance* de creatinina, parâmetros relacionados às excreções de sódio e potássio, e urinálise, encontra-se dentro dos valores de referência para a espécie, mas
2. a excreção urinária de proteína dos cães GRMD tem magnitude suficiente para sinalizar a existência de proteinúria patológica, e
3. a existência de proteinúria com sinais sugestivos de hiperfiltração glomerular são indicadores clínicos para investigação de possível doença glomerular dos cães GRMD.

Bibliografia

- BARTLETT, R. J. et al. *In vivo* Targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. **Nature Biotechnology**. v.18, p. 615-22, 2000.
- BROWN, S.A. Evaluation of a single-injection method for estimating glomerular filtration rate in dogs with reduced renal function. **American Journal of Veterinary Research**. v. 55, n.10, p. 1470 – 2, 1994.
- BROWN, S.A. Primary diseases of glomeruli. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 368 – 80, 1995.
- CARNEIRO, R.S. Contribuição ao estudo do *clearance* de creatinina e da excreção fracionada de sódio, potássio e uréia e determinação de valores de referência de indicadores de função renal em cães. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, p. 86, 2002.
- CARLSON, G.P. Fluid, electrolyte, and acid-base balance. In: KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 4thed. London: Academic Press, c. 19, p. 547 -9, 564 – 70, 1989.
- CARVALHO, M.B. et al. Métodos para avaliação de *clearance* de creatinina exógena em cães. Estudo desenvolvido pelo grupo de pesquisas em nefrologia e urologia, FCAV-UNESP. **Não publicado**.
- CHEW, D.J.; DiBARTOLA, S.P. Diagnóstico e fisiopatologia da moléstia renal. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3^a ed., Manole: São Paulo, c. 107, p. 1975 – 2046, 1992.
- COLLINS, C.A. e MORGAN, J.E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigated pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165 – 72, 2003.
- COOPER, B. J. et al. The Homologue of the duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**. V.334, p. 154-6, 1988.
- FINCO, D.R. Kidney function. In: KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 4th ed.London: Academic Press, p. 499 – 503, 518, 525 – 530, 1989.

- FINCO, D.R.; BARSANTI, J.A. Clinical evaluation of renal function. In: KIRK, R.W. **Current Veterinary Therapy**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 1123 – 6, 1989.
- FINCO, D.R. Aplied physiology of the kidney. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 29 – 46, 1995a.
- FINCO, D.R. Urinary protein loss. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 211 – 15, 1995b.
- FINCO, D.R. Evaluation of renal function. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 215 – 30, 1995c.
- FINCO, D.R. Congentital, inherited, and familial renal diseases. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 471 – 480, 1995d.
- GRAUER, G.F. Testes diagnósticos para o sistema urinário. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos da Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 344 – 85, 1994.
- KANEKO, J.J. Appendixes VII. In: _____. **Clinical Biochimistry of Domestic Animals**. 4th ed. London: Academic Press, c. 17, p. 375 – 403, 1989.
- KORNEGAY, J. N. et al. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Journal of Neurological Sciences**. v. 166, p. 115 – 21, 1999.
- LOBETTI, R.; LAMBRECHTS, N. Effects of general anaesthesia and surgery on renal function in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 61, n. 5, p. 577 – 81, 2000.
- McCAW, D.L.; FLEMING, E.J.; MINICIUK, M.G. Interpreting the results of urinalysis: A key to diagnosing renal disorders. **Veterinary Medicine**. v. __, n. __, p. 261 – 6, 1989.
- MEIER, H. Myopathies in the dog. **Cornell Veterinary**. v. 48, p. 313 – 30, 1958.
- MEYER, D.J. et al. Anormalidades em testes do trato urinário. In: _____. **Medicina de Laboratório Veterinária: Interpretação e Diagnóstico**. São Paulo: Roca, c.6, p. 63 – 72, 1995.

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.

Dissertação de Mestrado. FMVZ-USP, p.106, 2005.

NGUYEN, F. *et al.* Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. **Journal Compendium of Pathology.** 2002 V.126 , n.2-3, p.100-8.

OSBORNE, C.A.; *et. al.* A Clinician's analysis of urinalysis. In: **Canine and Feline Nephrology and Urology.** Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1st ed., p. 136 - 205, 1995.

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

SEGURO, A.C. *et al.* Processamento de água e eletrólitos pelos túbulos renais. In: Zatz, R. **Fisiopatologia Renal.** São Paulo: Atheneu, c. 5, p. 81 – 98, 2002.

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

CAPÍTULO 3

**FUNÇÃO RENAL E HOMEOSTASE DE ÁGUA, SÓDIO E
POTÁSSIO DE CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER
AFETADOS POR DISTROFIA MUSCULAR SUBMETIDOS À
IMUNOSSUPRESSÃO PARA TERAPIA CELULAR**

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética recessiva e hereditária, ligada ao cromossomo X, caracterizada pela ausência ou insuficiência da proteína distrofina no sarcolema das fibras musculares. É uma doença muscular progressiva, que afeta um em cada 3.500 meninos (BOGDANOVICH et al., 2004). É considerada a mais comum dentre as distrofias musculares (DMs) vinculadas ao cromossomo X (BERGMAN et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004).

Existem inúmeros modelos animais para pesquisa da DMD, passando por invertebrados e chegando aos cães. Dentre estes, os mais estudados são os Golden Retriever com Distrofia Muscular (GRMD). O modelo GRMD exhibe mudanças musculares comparáveis às vistas nos casos de DMD e a patogênese, bem como o fenótipo dos cães, é semelhante à observada na espécie humana. Os cães adultos têm massa corporal comparável a de pacientes com DMD. Por estas razões o GRMD vem sendo considerado, há alguns anos, o melhor modelo animal para o estudo da DMD (NGUYEN et al., 2002; COLLINS; MORGAN, 2003). Em função da similaridade com pacientes da DMD, os GRMD têm sido usados na busca de tratamentos definitivos para os humanos (BARTLETT et al., 2000).

Segundo FIRST (2002) em estudo que avaliou os avanços nas técnicas de transplantes heterólogos, tanto de órgãos quanto de tecidos e células, nos quais a imunossupressão é de importância relevante para que se evite a rejeição ao enxerto implantado, as atuais técnicas de imunossupressão têm resultado numa maior sobrevivência dos enxertos a curto e longo prazo.

A ciclosporina, uma gordura solúvel derivada dos fungos *Tolypocladium inflatum gams* e *Beauveria nivea*, apresenta-se sob a forma de polipeptídio cíclico composto por 11 aminoácidos com ação imunossupressora importante. Devido às diferenças estruturais dos peptídeos que formam as suas moléculas, a ciclosporina é classificada em tipos A, C, D e G (LIN-WANG; MANRIQUE, 2002). Trata-se de um macrolídeo imunossupressor com capacidade de ligar-se a uma proteína intracelular, a ciclofilina. Sua ação imunossupressora é dada primariamente pela habilidade do complexo ciclosporina/ciclofilina em inibir o sinal da via de transdução da fosfatase calcineurina e, desse modo, suprimindo a expressão de várias citocinas incluindo a interleucina-2. O resultado é uma inibição específica da função das células-T (ARMSTRONG, 2002; HAMEL et al., 2004). A ciclosporina A (CsA) foi introduzida, em 1978, para o tratamento em casos de transplantes alogênicos. A CsA possui como vantagem nefrotoxicidade baixa e, ao contrário dos corticosteróides e das azatioprinas, não causa mielossupressão quando empregada em doses terapêuticas (LIN-WANG; MANRIQUE, 2002; HAMEL et al., 2004).

Segundo HAMEL et al. (2004) a CsA é predominantemente absorvida no intestino delgado após ingestão. E, mesmo com os progressos recentes das formulações novas, a tolerância aos protocolos de CsA é, ainda, caracterizada por sérias reações adversas, especialmente, relacionadas à nefrotoxicidade, neurotoxicidade e hipertensão, se forem usadas doses altas. No entanto, otimizações nas dosagens da CsA são necessárias para que sejam alcançadas e mantidas concentrações séricas efetivas, as quais podem estar muito próximas dos valores tóxicos.

De acordo com, NOWAK e DAVIES (2004), considerando os estudos com terapia celular para os casos de DMD, os transplantes de células-tronco parecem ser mais promissores do que o de mioblastos. Isto, provavelmente, decorre do fato de que as células-tronco são muito mais prolíferas quando

transplantadas. Segundo PENG e HUARD (2004), a migração das células-tronco através do sistema circulatório após uma aplicação intra-arterial é muito mais efetiva que a dos mioblastos com relação à regeneração muscular e à expressão de distrofina após a implantação. TORRENTE et al. (2001) relataram que após aplicação de células-tronco derivadas de músculos em membros de mdx, estas migraram para a circulação e houve subsequente co-expressão de distrofina em todos os músculos.

Cães da raça Golden Retriever podem ser submetidos a transplante de células tronco se for instituído protocolo imunossupressor com CsA. Contudo, o protocolo ideal deve não só promover a imunossupressão necessária, como também preservar a vida do receptor e, a viabilização do transplante. Para tanto, considerando as características da GRMD e as possíveis ações deletérias da CsA sob o organismo, em especial, sob a volemia e, por conseguinte, sob a função renal. Concluiu-se que testes para a correta avaliação e acompanhamento do funcionamento dos rins destes animais, durante os protocolos de imunossupressão, devem fazer parte dos cuidados médicos requeridos pelos mesmos.

O *clearance* de creatinina (Ccr) é um teste mais preciso que o valor sérico de creatinina para a avaliação da função glomerular. Já a excreção fracionada de solutos (sódio e potássio) é considerada útil para avaliação da função tubular. Os valores normais variam com o tipo de substância a ser excretada na urina e em geral são apresentados sob a forma de um percentual. Para o sódio é considerado normal um percentual de até 1%; no caso do potássio é considerado normal um percentual de até 20% (STEINER, 1984; GRAUER, 1994; CARNEIRO, 2002).

2 – Hipótese e objetivo

Neste estudo foram investigados os efeitos do uso do imunossupressor, sobre a função renal de cães normais e afetados pela GRMD. Os animais foram, ainda, comparados entre si, com a finalidade de se verificar se a associação das características clínicas da GRMD com o imunossupressor, ciclosporina A, um agente potencialmente nefrotóxico, desencadearia lesões renais, durante a execução de terapia celular, possivelmente, comprometendo a mesma.

3 - MATERIAL e MÉTODO

Comissão de Bioética

O projeto proposto foi conduzido após aprovação por uma comissão de bioética¹⁴.

Animais

Foram utilizados no experimento 23 cães da raça Golden Retriever normais (11) e afetados pela distrofia muscular (12) 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 machos 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. Todos os animais pertencentes ao canil foram mantidos sob condições adequadas de cuidados médicos veterinários, alimentação, higiene, e recreação.

¹⁴ Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos em quatro grupos, o primeiro foi composto por cães machos normais (GN=7), a seguir foi formado um grupo com cães afetados pela GRMD (GA=8), o próximo grupo foi composto por cães normais submetidos à imunossupressão (GI=4), por fim, o último grupo foi composto por machos afetados pela GRMD imunossuprimidos e submetidos a transplante de células-tronco (GIT=4).

Os cães de GN e GA tiveram seus parâmetros relacionados à função renal e à homeostase de água, sódio e potássio verificados em uma única oportunidade.

Os animais pertencentes ao GI receberam tratamento com o imunossupressor ciclosporina A (CsA). Os animais GIT receberam CsA e foram submetidos a transplante de células tronco de cordão umbilical. 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 objetivo deste estudo não foi a padronização de uma dose ideal de CsA para cães GRMD, com intuito de se estabelecer um protocolo para a terapia celular.

O transplante de celular (GIT) 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. Ao longo do período de tratamento, iniciado no dia dois do experimento foram avaliados os parâmetros relativos à função renal. O Quadro 9 apresenta o sumário das intervenções e avaliações realizadas, de acordo com os dias de experimento. No quadro 10 estão apresentadas as média±desvios padrões das idades e pesos dos grupos experimentais.

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 24 horas/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.

Problemas com a ingestão de alimento ou de água, esperados nos cães GRMD, foram minimizados, através de adaptações na dieta, forma de administração deste e, modo e frequência com que se oferecia água aos cães.

Quando necessário os animais receberam fluidoterapia, a base de solução de Ringer com Lactato¹⁵, ou quando as avaliações indicavam os cães recebiam solução de cloreto de sódio a 0,9%¹⁶.

Em se fazendo necessário o animal recebia, ainda, terapia de suporte que consistia no uso de cloridrato de metoclopramida¹⁷, cloridrato de ranitidina¹⁸, furosemida¹⁹, complexo B²⁰ e solução de glicose 50%²¹, tudo visando seu equilíbrio e sustentação clínica. Em alguns casos, os animais apresentaram sinais de infecção do trato urinário inferior, as mesmas foram tratadas com ampicilina²² ou enrofloxacina²³, ocorrendo total remissão dos sinais clínicos e laboratoriais em quinze dias de tratamento.

¹⁵ Solução de Ringer com Lactato – JP laboratório – São Paulo – SP.

¹⁶ Solução de Cloreto de Sódio 0,9% - Darrow – São Paulo – SP.

¹⁷ Plasil® - Aventis Pharma – São Paulo – SP.

¹⁸ Antak® - GlaxoSmithkline – São Paulo – SP.

¹⁹ Lasix® - Aventis Pharma – São Paulo – SP.

²⁰ Complexo B – Roche laboratórios – São Paulo – SP.

²¹ Solução de Glicose 50% - Darrow – São Paulo – SP.

²² Ampicilina – Abbott – São Paulo – SP.

²³ Flotril® - Schering-ploug – São Paulo – SP.

Quadro 9 – Distribuição das intervenções e avaliações ao longo de 30 dias de estudo de cães da raça Golden Retriever normais (GI) e de 67 dias no caso dos afetados por Distrofia Muscular (GIT), submetidos a tratamento com Ciclosporina A, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Momentos/intervenções			Avaliações							
Semanas	Dias	CsA	[CsA]	Hemo	Perfil Hepático	Ccr	Urina UP: C	Perfil complem.	Exame Clínico	Urinálise
Primeira	1									
	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 (GIT)

■ administrações de CsA

■ avaliações

QUADRO 10 – Análise dos dados relativos às idades e pesos dos membros de cada um dos 4 grupos experimentais, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Grupos	Idades (meses)			Peso corporal (kg)		
	X±SD	min	max	X±SD	min	max
GN	15,37±20,37	3	48	18,93±11,63	8,2	38,30
GA	9,37±8,93	3	30	13,15±6,58	6,8	23,50
GI	3,00±0,00	3	3	10,66±4,00	8,20	16,65
GIT	6,00±3,83	3	11	11,80±5,38	11,50	19,45

GA = grupo de afetados; GI = grupo de machos normais imunossuprimidos; GIT = grupo de afetados imunossuprimidos e transplantados; GN = grupo de machos normais.

Coleta de amostras e exames laboratoriais

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 refratometria²⁴. O pH urinário foi determinado através de pHmetro²⁵. Os demais parâmetros bioquímicos da urinálise de rotina foram mensurados por meio de tiras reagentes²⁶. A sedimentoscopia foi feita em microscópio² com aumento de 250 a 400x, após centrifugação²⁷ da urina.

Bioquímicas sérica e urinária

As análises bioquímicas séricas e urinárias foram feitas em amostras do soro obtidas após sinérese de sangue coletado por punção da veia jugular, nos Laboratórios de Nefrologia e Urologia Veterinária e de Patologia Clínica da UNESP - Jaboticabal.

Utilizando o sistema Labtest²⁸ para diagnóstico, alíquotas das amostras de soro foram processadas para determinação de creatinina (método de Jaffé²⁹

²⁴ Refratometro UGI (1000-1050) Atago

²⁵ Phmetro de bolso Q-400 BD QUIMIS

²⁶ COMBUR¹⁰ TEST - Boehringer Mannheim Argentina S.A., Buenos Aires.

²⁷ Centrifuga – Celm LS3 plus

²⁸ LABTEST Diagnóstica S.A. – Lagoa Santa , MG

modificado); uréia (UV-cinética – pelo método do diacetil modificado); 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.

TESTES DE FUNÇÃO RENAL

Clearance de creatinina endógena e Exceção fracionada de solutos

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 FINCO (1995) e modificado por CARVALHO et al. (1998), nas próprias dependências do Canil GRMD - Brasil. A avaliação da excreção fracionada de solutos seguiu os padrões estabelecidos por FINCO (1995).

ANÁLISE EXTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise de variância foi feita no Sigma Stat Analysis System, quando os dados apresentaram um comportamento, que se acomodavam a uma curva de normalidade os mesmos foram avaliados pela análise de variância simples, sendo a comparação das médias entre os quatro grupos estudados analisada pelo método de Holm-Sidak. Já no caso, dos dados que não apresentaram curva de normalidade, a avaliação escolhida foi à análise de variância por postos ou método de Kruskal-Wallis, a comparação das médias entre os quatro diferentes grupos foi feita empregando-se o método de Dunn.

²⁹ Método do picrato alcalino

4 - RESULTADOS

A tabela 6 apresenta os resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relacionados à função renal de 7 cães machos normais da raça Golden Retriever (GN). A tabela 7 expõe os resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relacionados à função renal de 8 cães machos afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever (GA). A tabela 8 apresenta os resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relacionados à função renal de cães 4 machos, filhotes, normais, submetidos à imunossupressão (GI). A tabela 9 expõe os resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relacionados à função renal de 4 cães machos, filhotes, afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever imunossuprimidos e submetidos a transplante de células-tronco de cordão umbilical autólogas (GIT). A comparação entre os dados analisados nas quatro tabelas possibilita a compreensão de que se evidenciam certos comportamentos entre os grupos. A creatinina sérica dos grupos GA e GIT, ambos afetados pela GRMD, foi inferior a verificada nos demais grupos. O mesmo ocorreu com a concentração sérica do íon potássio, mas apenas para o grupo GA, aparentemente a imunossupressão teve efeitos sobre o metabolismo deste íon, como se pode verificar pelo comportamento da excreção fracionada do íon e do potássio excretado, ambos estavam muito aumentados em GA, mas em GIT retornaram aos valores de normalidade. O maior volume de urina encontrado foi no GI, o que possivelmente deve estar relacionada a alguma ação do imunossupressor sobre a função renal, assim

como o maior valor para excreção urinária de proteínas, obtido pela razão proteína:creatinina urinária foi encontrado, também, em GI possivelmente por uma ação nefrotóxica transitória do agente imunossupressor.

TABELA 6 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 7 cães machos normais da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Scr	0,99	0,39	0,15	0,86	0,62	1,76
Sur	24,34	9,51	3,36	22,50	12,65	37,41
VU	23,13	16,30	6,16	18,29	8,77	49,89
U-P/C	0,21	0,15	0,05	0,20	0,04	0,49
Ccr	2,12	0,73	0,28	1,92	1,20	3,05
SNa	146,29	6,63	2,50	144,00	138,00	157,00
EfNa	0,66	0,26	0,10	0,77	0,28	1,01
SK	4,34	0,98	0,37	4,60	3,30	5,50
EfK	12,36	16,43	6,21	6,30	1,03	48,74
CfNa	$308,4 \times 10^{-3}$	$105,0 \times 10^{-3}$	$39,7 \times 10^{-3}$	265×10^{-3}	173×10^{-3}	457×10^{-3}
NaEx	$2,2 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-3}$	2×10^{-3}	$0,7 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$
CfK	$9,0 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	9×10^{-3}	5×10^{-3}	16×10^{-3}
KEx	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-3}$	$0,7 \times 10^{-3}$	$0,1 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$

Scr = concentração sérica de creatinina (mg/dL); VU = volume urinário ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$); Ccr = *clearance* de creatinina ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$); concentração sérica de sódio (mEq/L); EfNa = excreção fracionada de sódio (%); SK = concentração sérica de potássio (mEq/L); EfK = excreção fracionada de potássio (%); CfNa = carga filtrada de sódio (mEq/min/kg); NaEx = sódio excretado (mEq/min/kg); CfK = carga filtrada de potássio (mEq/min/kg); KEx = potássio excretado (mEq/min/kg); Sur – uréia sérica (mg/dL); U-P/C = razão proteína:creatinina urinária.

TABELA 7 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 8 cães machos afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Scr	0,72	0,15	0,04	0,75	0,50	1,00
Sur	34,88	7,59	2,10	33,17	23,00	50,00
VU	38,13	27,58	7,65	39,81	6,69	77,89
U-P/C	0,53	0,44	0,14	0,36	0,15	1,35
Ccr	3,50	0,79	0,22	3,51	1,98	4,53
SNa	142,00	4,58	1,27	143,00	132,00	150,00
EfNa	0,74	0,80	0,22	0,50	0,04	2,93
SK	3,89	0,79	0,22	3,40	3,30	5,40
EfK	15,46	9,69	2,69	14,63	2,17	36,84
CfNa	496×10^{-3}	$106,8 \times 10^{-3}$	$29,6 \times 10^{-3}$	504×10^{-3}	298×10^{-3}	645×10^{-3}
NaEx	$2,3 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-3}$	$0,7 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$
CfK	$13,8 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$	12×10^{-3}	9×10^{-3}	24×10^{-3}
KEx	$2,1 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$0,4 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$0,4 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-3}$

Scr = concentração sérica de creatinina (mg/dL); VU = volume urinário ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$); Ccr = *clearance* de creatinina ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$); concentração sérica de sódio (mEq/L); EfNa = excreção fracionada de sódio (%); SK = concentração sérica de potássio (mEq/L); EfK = excreção fracionada de potássio (%); CfNa = carga filtrada de sódio (mEq/min/kg); NaEx = sódio excretado (mEq/min/kg); CfK = carga filtrada de potássio (mEq/min/kg); KEx = potássio excretado (mEq/min/kg); Sur – uréia sérica (mg/dL); U-P/C = razão proteína:creatinina urinária.

TABELA 8 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 4 cães machos normais, da raça Golden Retriever, submetidos a imunossupressão. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Scr	0,79	0,13	0,04	0,83	0,60	0,98
Sur	31,09	12,58	2,13	33,00	11,70	58,00
VU	69,39	57,67	16,00	39,70	24,90	197,50
U-P/C	0,79	1,02	0,19	0,33	0,06	3,66
Ccr	2,78	0,52	0,15	2,73	1,16	3,52
SNa	148,92	6,81	1,89	150,00	134,00	157,00
EfNa	1,35	0,76	0,21	1,41	2,61	0,76
SK	5,17	0,27	0,08	5,20	4,50	5,50
EfK	11,02	7,14	1,98	7,87	3,53	26,49
CfNa	415×10^{-3}	$84,6 \times 10^{-3}$	$23,5 \times 10^{-3}$	408×10^{-3}	239×10^{-3}	553×10^{-3}
NaEx	$5,5 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$	$0,9 \times 10^{-3}$	$5,95 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	$10,2 \times 10^{-3}$
CfK	$14,3 \times 10^{-3}$	3×10^{-3}	$0,8 \times 10^{-3}$	14×10^{-3}	8×10^{-3}	19×10^{-3}
KEx	$1,5 \times 10^{-3}$	$0,8 \times 10^{-3}$	$0,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-3}$

Scr = concentração sérica de creatinina (mg/dL), VU = volume urinário (μ L/min/kg); Ccr = *clearance* de creatinina (mL/min/kg); concentração sérica de sódio (mEq/L); EfNa = excreção fracionada de sódio (%); SK = concentração sérica de potássio (mEq/L); EfK = excreção fracionada de potássio (%); CfNa = carga filtrada de sódio (mEq/min/kg); NaEx = sódio excretado (mEq/min/kg); CfK = carga filtrada de potássio (mEq/min/kg); KEx = potássio excretado (mEq/min/kg); Sur – uréia sérica (mg/dL); U-P/C = razão proteína:creatinina urinária.

TABELA 9 – Resultados da análise estatística descritiva de parâmetros relativos à função renal de 4 cães machos afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever, submetidos a imunossupressão e transplante de células-tronco. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetros	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Scr	0,68	0,15	0,05	0,69	0,37	0,93
Sur	30,89	8,94	1,36	29,26	21,00	58,00
VU	24,40	15,37	3,62	19,03	9,57	60,76
U-P/C	0,54	0,44	0,06	0,34	0,02	2,48
Ccr	3,19	0,84	0,20	3,25	1,28	4,57
SNa	145,44	7,02	1,66	142,00	137,00	161,00
EfNa	0,76	0,57	0,13	0,54	0,10	1,79
SK	4,38	0,80	0,19	4,30	3,30	5,50
EfK	10,41	8,72	2,05	6,92	2,34	31,03
CfNa	463×10^{-3}	120×10^{-3}	28×10^{-3}	461×10^{-3}	$0,6 \times 10^{-3}$	$11,5 \times 10^{-3}$
NaEx	$3,4 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-3}$	$0,7 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-3}$	$11,6 \times 10^{-3}$
CfK	$13,9 \times 10^{-3}$	$4,1 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	14×10^{-3}	6×10^{-3}	22×10^{-3}
KEx	$1,3 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$0,3 \times 10^{-3}$	$0,9 \times 10^{-3}$	$0,2 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$

Scr = concentração sérica de creatinina (mg/dL), VU = volume urinário (μ L/min/kg); Ccr = *clearance* de creatinina (mL/min/kg); concentração sérica de sódio (mEq/L); EfNa = excreção fracionada de sódio (%); SK = concentração sérica de potássio (mEq/L); EfK = excreção fracionada de potássio (%); CfNa = carga filtrada de sódio (mEq/min/kg); NaEx = sódio excretado (mEq/min/kg); CfK = carga filtrada de potássio (mEq/min/kg); KEx = potássio excretado (mEq/min/kg); Sur – uréia sérica (mg/dL); U-P/C = razão proteína:creatinina urinária.

Na tabela 10 verifica-se que a creatinina sérica do grupo de machos normais (GN) foi significativamente maior, quando comparada a do grupo dos machos afetados (GA), no entanto, não diferiu estatisticamente do grupo dos

machos normais imunossuprimidos (GI) e nem do grupo dos machos afetados imunossuprimidos e transplantados (GIT). Por outro lado, o *clearance* de creatinina foi significativamente maior para GA e GIT, sendo que ambos diferiram entre si, tanto quanto entre os demais. Da mesma forma, a carga filtrada de sódio foi maior para os grupos GIT e GA, embora ambos tenham diferido significativamente entre si, tanto quanto entre os demais grupos. A carga filtrada de potássio, por outro lado, diferiu significativamente do GN, mas foi similar para os grupos GA, GI e GIT.

Na tabela 11 temos apresentados os demais parâmetros da função renal, no entanto, não houve diferença significativa do ponto de vista estatístico entre eles para nenhum dos quatro grupos estudados.

TABELA 10 – Resultados de análise de variância e comparação das médias (Holm Sidak) de valores relativos à função renal de cães da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetro	Grupos	Média ± desvio padrão	Valor de P
Creatinina sérica (mg/dL)	7 ♂ normais	0,99 ± 0,39 ^a	0,006
	8 ♂ afetados	0,72 ± 0,15 ^b	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	0,79 ± 0,13 ^{ab}	
	4 ♂ afetados imun. transplantados	0,68 ± 0,15 ^b	
Volume de urina (μL/min/kg)	7 ♂ normais	23,13 ± 16,30 ^a	0,004
	8 ♂ afetados	38,13 ± 27,58 ^{ab}	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	69,39 ± 57,67 ^b	
	4 ♂ afetados imun. Transplantados	24,40 ± 15,37 ^a	
Clearance de creatinina (mL/min/kg)	7 ♂ normais	2,12 ± 0,73 ^a	0,001
	8 ♂ afetados	3,50 ± 0,79 ^b	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	2,78 ± 0,52 ^{ab}	
	4 ♂ afetados imun. transplantados	3,19 ± 0,84 ^b	
Razão proteína:creatinina urinária	7 ♂ normais	0,21 ± 0,15	0,112
	8 ♂ afetados	0,53 ± 0,44	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	0,79 ± 0,50	
	4 ♂ afetados imun. transplantados	0,54 ± 0,47	
Potássio sérico (mEq/L)	7 ♂ normais	4,34 ± 0,98 ^{ab}	0,001
	8 ♂ afetados	3,89 ± 0,79 ^a	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	5,17 ± 0,27 ^b	
	4 ♂ afetados imun. transplantados	4,38 ± 0,79 ^a	
Sódio sérico (mEq/L)	7 ♂ normais	146,29 ± 6,63	0,064
	8 ♂ afetados	142 ± 4,58	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	148,92 ± 6,81	
	4 ♂ afetados imun. transplantados	145,44 ± 7,02	
Excreção Fracionada de sódio (mEq/L)	7 ♂ normais	0,66 ± 0,26	0,048
	8 ♂ afetados	0,74 ± 0,80	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	1,36 ± 0,76	
	4 ♂ afetados imun. transplantados	0,76 ± 0,57	
Carga filtrada de sódio (mEq/min/kg)	7 ♂ normais	308,43 ± 105,02 ^a	0,003
	8 ♂ afetados	495,69 ± 106,77 ^b	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	415,08 ± 84,64 ^{ab}	
	4 ♂ afetados imun. Transplantados	463,28 ± 120,00 ^b	
Carga filtrada de potássio (mEq/min/kg)	7 ♂ normais	9,00 ± 3,56 ^a	0,029
	8 ♂ afetados	13,77 ± 4,69 ^{ab}	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	14,31 ± 2,96 ^b	
	4 ♂ afetados imun. Transplantados	13,94 ± 4,11 ^b	

FCAV = faculdade de ciências agrárias e veterinárias; UNESP = universidade estadual paulista; FMVZ = faculdade de medicina veterinária e zootecnia; USP = universidade de São Paulo..

TABELA 11 – Resultados de análise de variância por postos (Kruskal-Wallis) e comparação das medianas (Dunn) de valores relativos à função renal de cães da raça Golden Retriever. FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

Parâmetro	Grupos	Mediana	Valor de P
Uréia sérica (mg/dL)	7 ♂ normais	22,50	0,117
	8 ♂ afetados	33,17	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	33,00	
	4 ♂ afetados imun. Transplantados	29,26	
Excreção fracionada de potássio (%)	7 ♂ normais	6,30	0,311
	8 ♂ afetados	14,63	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	7,87	
	4 ♂ afetados imun. Transplantados	6,92	
Sódio Excretado (mEq/min/kg)	7 ♂ normais	2,02	0,041
	8 ♂ afetados	1,95	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	5,95	
	4 ♂ afetados imun. Transplantados	2,57	
Potássio Excretado (mEq/min/kg)	7 ♂ normais	0,65	0,067
	8 ♂ afetados	1,61	
	4 ♂ normais imunossuprimidos	1,21	
	4 ♂ afetados imun. Transplantados	0,93	

FCAV = faculdade de ciências agrárias e veterinárias; UNESP = universidade estadual paulista; FMVZ = faculdade de medicina veterinária e zootecnia; USP = universidade de São Paulo..

A figura 6 apresenta a representação gráfica dos valores individuais mais as médias $\pm$ erros padrões de parâmetros relacionados à função renal para os quatro grupos de animais estudados; GN (machos normais), GA (machos afetados); GI (machos normais imunossuprimidos), e GIT (machos afetados imunossuprimidos e transplantados). Têm-se a concentração sérica de creatinina (mg/dL), volume urinário (μ L/min/kg) e o *clearance* de creatinina (mL/min/kg), sendo possível comparar o comportamento dos indivíduos dentro do grupo, e dos grupos entre si.

A figura 7 apresenta a representação gráfica dos valores individuais mais as médias $\pm$ erros padrões do manejo glomerular e tubular do íon sódio para os quatro grupos de animais estudados; GN (machos normais), GA (machos afetados); GI (machos normais imunossuprimidos), e GIT (machos afetados imunossuprimidos e transplantados). Têm-se a concentração sérica de sódio (mEq/L), a carga filtrada de sódio (mEq/min/kg), excreção fracionada

do íon (%) e o sódio excretado (mEq/min/kg), sendo possível uma comparação entre os indivíduos de um mesmo grupo e entre os grupos.

A figura 8 apresenta a representação gráfica dos valores individuais mais as médias $\pm$ erros padrões do manejo glomerular e tubular do íon potássio para os quatro grupos de animais estudados; GN (machos normais), GA (machos afetados); GI (machos normais imunossuprimidos), e GIT (machos afetados imunossuprimidos e transplantados). Têm-se a concentração sérica de potássio (mEq/L), a carga filtrada de potássio (mEq/min/kg), excreção fracionada do íon (%) e o potássio excretado (mEq/min/kg), sendo possível uma comparação entre os indivíduos de um mesmo grupo e entre os grupos.

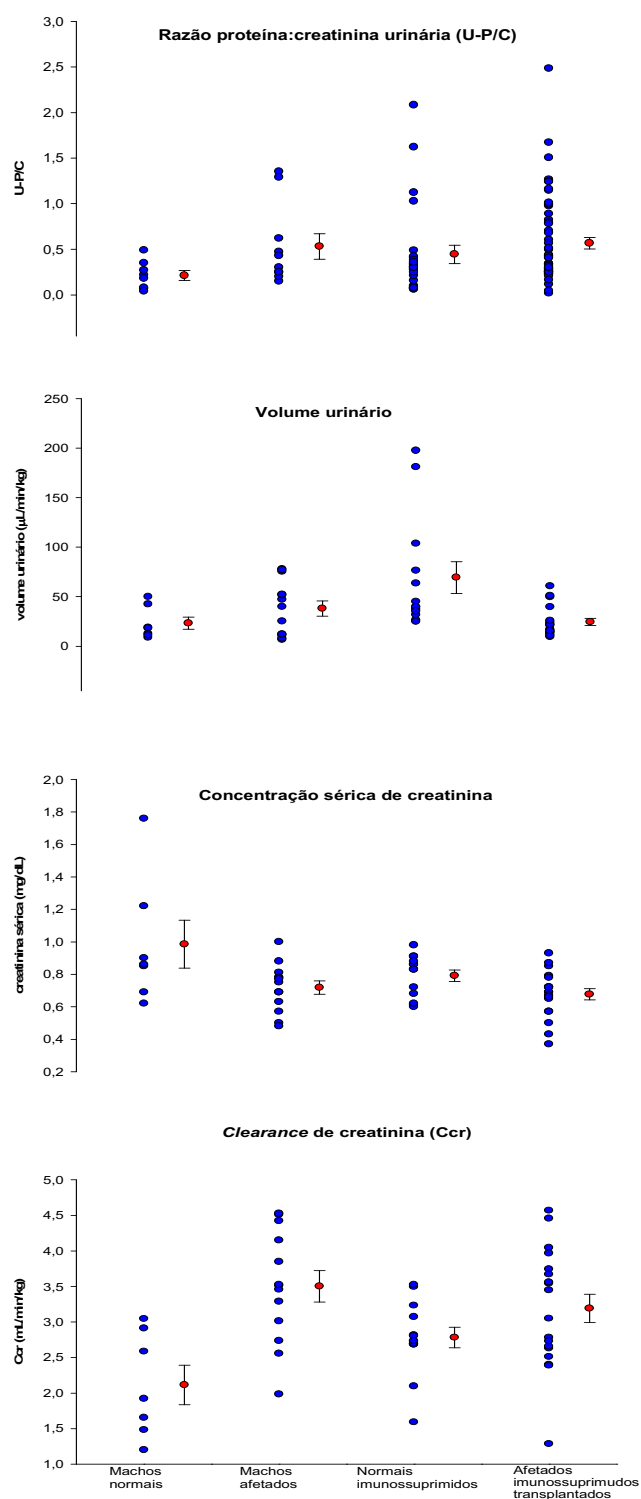


FIGURA 6 - Representação gráfica dos valores individuais mais as médias $\pm$ erros padrões de creatinina sérica (mg/dL); volume urinário ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$); *clearance* de creatinina (mL/min/kg) e razão proteína:creatinina urinária (U-P/C), para GN (machos normais), GA (machos afetados), GI (machos imunossuprimidos) e GIT (machos afetados imunossuprimidos e transplantados), FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

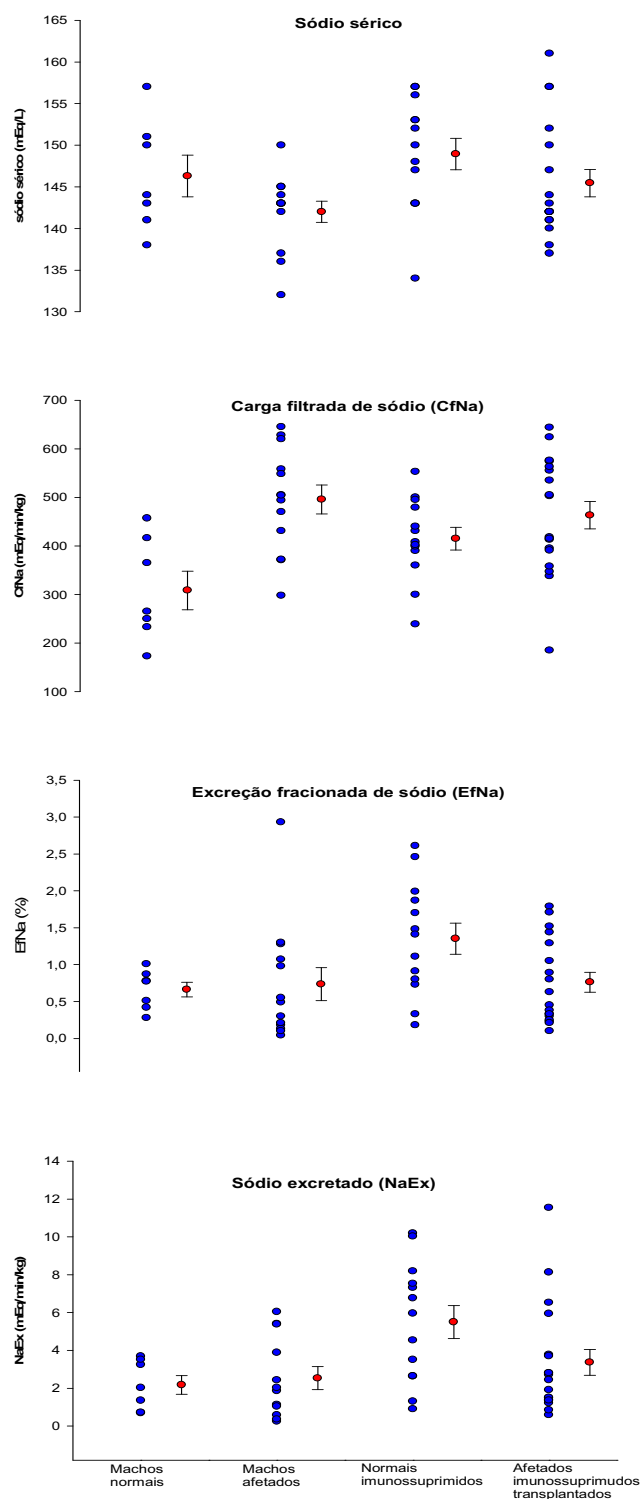


FIGURA 7 - Representação gráfica dos valores individuais mais as médias $\pm$ erros padrões de sódio sérico (mEq/L), carga filtrada deste íon (mEq/min/kg), excreção fracionada de sódio (%) e sódio excretado (mEq/min/kg), para GN, GA, GI e GIT, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

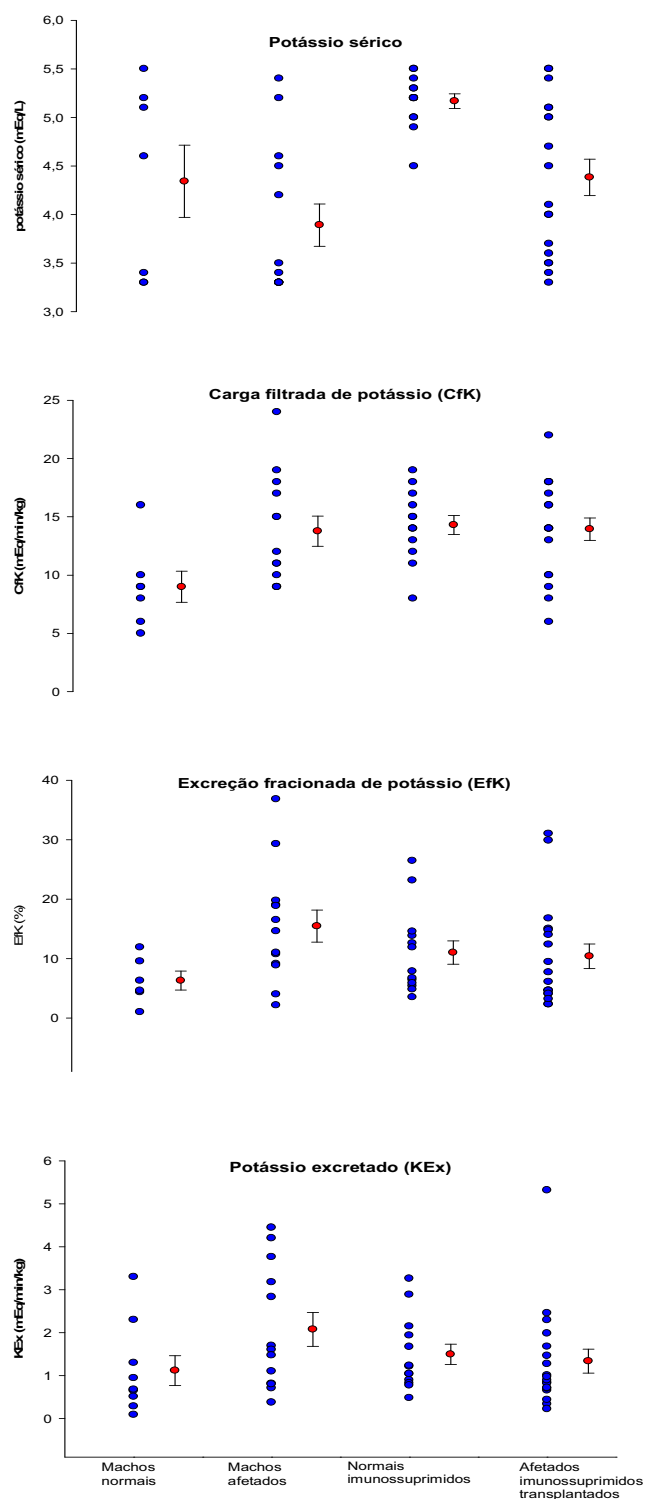


FIGURA 8 - Representação gráfica dos valores individuais mais as médias $\pm$ erros padrões de sódio sérico (mEq/L), carga filtrada deste íon (mEq/min/kg), excreção fracionada de sódio (%) e sódio excretado (mEq/min/kg), para GN, GA, GI e GIT, FCAV-UNESP/FMVZ-USP, Jaboticabal, 2007.

5 - DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados dois grupos de cães machos da raça Golden Retriever, um composto por animais normais (GN) e o outro por cães com GRMD (GA). Inicialmente foram obtidos os valores basais para os parâmetros relativos à função renal (controle). Algumas diferenças foram observadas entre os dois grupos. A concentração de creatinina sérica do GA ($0,72 \pm 0,15 \text{ mg/dL}$) foi menor do que a do GN ($0,99 \pm 0,39 \text{ mg/dL}$). A creatinina é formada nos músculos pela degradação não enzimática da creatina e sua concentração plasmática tem relação direta com a massa muscular (FINCO, 1995c). Os cães do GA tinham massa corporal menor do que a dos GN, como pode ser verificado pelo peso corporal ($13,15 \pm 6,58 \text{ kg}$ e $18,93 \pm 11,63 \text{ kg}$, respectivamente). A diferença de peso pode ser relacionada à idade (GA: $9,37 \pm 8,93$ meses e GN: $15,37 \pm 20,37$ meses) mas, também, à distrofia muscular determinada pela GRMD (COLLINS; MORGAN, 2003; SHELTON; ENGVALL, 2004). Outro fator, a ser considerado, está relacionado à depuração de creatinina que é feita por filtração glomerular (FINCO, 1995a). A taxa de filtração glomerular dos cães GA foi maior do que a dos GN, como estimado pelo clearance de creatinina ($3,50 \pm 0,79 \text{ mL/min/kg}$ e $2,12 \pm 0,73 \text{ mL/min/kg}$, respectivamente). E, também como efeito da taxa de filtração glomerular, os cães GA apresentaram o maior valor de carga filtrada de sódio. Contudo, a excreção de sódio do GA não variou significativamente em relação à observada no GN, indicando o trabalho tubular.

Embora a análise estatística não tenha detectado diferença significativa entre os valores de excreção urinária de proteína entre os dois grupos, os cães do GA apresentaram U-P/C de $0,53 \pm 0,44$, valor este indicativo da possibilidade de haver glomerulopatia (BROWN, 1995) uma vez que é maior do que 0,3 que seria o limite máximo de normalidade para cães (FINCO, 1995b).

A condição clínica verificada dos cães GRMD evidenciava, além dos sinais típicos da distrofia muscular, desidratação leve (6 a 7%). Em princípio, o desequilíbrio parece ser desencadeado pela dificuldade de deglutir decorrente da hipertrofia da musculatura da língua associada com atrofia da musculatura da face e pescoço. Os animais apresentam dificuldade para tomar água e, não sendo capazes de deglutir a saliva, perdem líquido. Apesar deste quadro, os animais tinham filtração glomerular dentro do limite de normalidade para cães e maior do que o observado para os do grupo de animais normais. Em condições renais fisiológicas, a produção de urina deve diminuir se houver desidratação (FINCO, 1995c), o que não ocorreu com os GA. Adicionalmente, foi detectado aumento da excreção urinária de proteína. Estes fatos permitem levantar a hipótese de que os cães afetados pela distrofia muscular tinham aumento da pressão capilar glomerular. Neste caso, haveria hiperfiltração desencadeada por glomerulopatia por lesão mínima (BROWN, 1995) ou pela redução do número de glomérulos funcionantes em decorrência de doença assemelhada à displasia renal ou à doença glomerular hereditária do cão samoieda (FINCO, 1995d). Como resultado das propriedades físicas da barreira glomerular e da absorção tubular, a quantidade de proteínas que chega à urina final, em condições normais, é extremamente pequena, da ordem de poucas dezenas de miligramas/dia. Qualquer aumento persistente da excreção urinária de proteínas é a princípio de natureza patológica. Nos casos, em que este aumento é pequeno e sem repercussão clínica, a avaliação criteriosa pode permitir o diagnóstico precoce de alterações renais, especialmente, as de origem glomerular (SEGURO; MALNIC; ZATZ, 2002).

Como já é relatado (HAMEL et al., 2004) a CsA pode ser nefrotóxica o que justifica a avaliação de seus possíveis efeitos em cães, especialmente os GRMD.

Os cães normais sob tratamento com CsA (GI), mantiveram o valor de Ccr, mas houve aumento importante, e significativo, do volume de urina (de

23,13±16,30µL/min/kg para 69,39±57,67µL/min/kg). A carga filtrada de potássio também foi significativamente maior neste grupo (GN: 9,0±3,56mEq/min/kg e GI 14,0±2,96mEq/min/kg), certamente em função da concentração sérica do íon que, embora não tenha mostrado diferença estatística, foi maior no GI do que no GN (5,17±0,27mEq/L e 4,34±0,98mEq/L, respectivamente). Outro evento importante foi relacionado à excreção urinária de proteína. As médias de U-P/C não diferiram significativamente entre si, contudo os cães do GI alcançaram valor de 0,44±0,5 indicativo de proteinúria anormal. Contudo, ao serem avaliados, individualmente, os animais, verificou-se que, de fato, a proteinúria foi marcante (1,6 a 3,7) em um indivíduo apenas. Outros dois apresentaram, ao longo do período de tratamento, valores ao redor de 0,3. Este resultado evidencia que a CsA pode determinar a ocorrência de proteinúria em graus que variam entre os valores limítrofes (0,3 a 1,0) e os francamente patológicos (>1,0) de acordo com o proposto por (FINCO, 1995b).

No caso dos cães GRMD, o tratamento com CsA não determinou alterações significativas dos parâmetros estudados. A proteinúria verificada em condição basal (sem CsA) foi mantida ao longo do período de tratamento. O mesmo ocorreu em relação ao Ccr. Entretanto, houve aumento discreto da concentração de potássio sérico acompanhado por diminuição do volume de urina e do potássio excretado. Estes eventos são indicativos de modificação do trabalho tubular sem sinais de mudança glomerular.

As alterações dos aspectos renais do metabolismo de potássio na GRMD e a constatação de reversão durante o tratamento com CsA, sem normalização da função tubular, são indicadoras de que os túbulos renais não são afetados pela doença.

6 – Conclusões

Guardados os métodos e o protocolo experimental do presente estudo, pode ser concluído o que se segue, para cães com Distrofia Muscular da raça Golden Retriever.

1. A existência de proteinúria com sinais de hiperfiltração glomerular são indicadores clínicos para investigação de possível doença glomerular dos cães GRMD,
2. tratamento imunossupressor com ciclosporina A esta associado com proteinúria patológica em alguns cães da raça Golden Retriever, inicialmente saudáveis,
3. se os cães forem GRMD, a proteinúria pré-existente não é modificada pelo tratamento com ciclosporina A,
4. as alterações dos aspectos renais do metabolismo de potássio na GRMD e a constatação de reversão durante o tratamento com CsA, sem normalização da função tubular, são sugestivas de que (1) a distrofia muscular é a origem dos fatores que afetam o metabolismo de potássio, (2) os túbulos renais dos GRMD podem responder normalmente aos fatores humorais de regulação do potássio e, (3) o tratamento com CsA interfere na fisiopatologia da musculatura dos cães GRMD, de modo a regularizar o metabolismo de potássio.

Bibliografia

- ARMSTRONG, V. W. Principles and practice of monitoring immunosuppressive drugs. **Journal of Laboratory Medicine**. v. 26, n. 1/2, p. 27 – 36, 2002.
- BARTLETT, R. J. et al. *In vivo* Targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric rna/dna oligonucleotide. **Nature Biotechnology**. v.18, p. 615-22, 2000.
- BENSOUSSAN, D., et al. 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. et al. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a labrador retriever. **Journal of American Hospital Association**. v. 38, n. 3, may-jun, p. 213 – 19. 2002.
- BOGDANOVICH, S., et al. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **J. Mol. Med.**, v.82, n.2, p.102-115, 2004.
- BROWN, S.A. Primary diseases of glomeruli. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 368 – 80, 1995.
- CARNEIRO, R.S. Contribuição ao estudo do *clearance* de creatinina e da excreção fracionada de sódio, potássio e uréia e determinação de valores de referência de indicadores de função renal em cães. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, p. 86, 2002.
- COLLINS, C.A. e MORGAN, J.E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigated pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165 – 72, 2003.
- FINCO, D.R. Aplied physiology of the kidney. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 29 – 46, 1995a.
- FINCO, D.R. Urinary protein loss. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 211 – 15, 1995b.

- FINCO, D.R. Evaluation of renal function. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 215 – 30, 1995c.
- FINCO, D.R. Congenital, inherited, and familial renal diseases. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 471 – 480, 1995d.
- FIRST, M.R. Immunosuppressive agents and their actions. **Transplantation Proceedings**. V. 34, p.1369-1372, 2002.
- GRAUER, G.F. Testes diagnósticos para o sistema urinário. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos da Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 344 – 85, 1994.
- HAMEL, A. R. et. al. Cyclosporin A prodrugs: design, sintesis and biophysical properties. **Journal of Peptide Research**. v. 63, p. 147 – 54, 2004.
- ITO, H. et al. Myoblast transplantation in non-dystrophic dog. **Neuromuscular Disorders** n.8, p.95-110, 1998.
- KORNEGAY, J. N.; et al. 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.
- LIN-WANG, H.T. e 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.
- 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. **Dissertação de Mestrado**. FMVZ-USP, p.106, 2005.
- NGUYEN, F. et al. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. **Journal Compendium of Pathology**. V.126, n.2-3, p.100-8, 2002.
- NOWAK, K. J. e DAVIES, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. **European Molecular Biology Organization**. v. 5, n. 9, p. 872 – 6, 2004.
- PENG, H. e HUARD, J. Muscle – Derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. **Transplant Immunology**. v. 12, p. 311 – 9, 2004.

SEGURO, A.C.; MALNIC, G.; ZATZ, R. Distúrbios do metabolismo de potássio. In: ZATZ, R. **Fisiopatologia Renal**. Rio de Janeiro, 2^aed., Ed. Atheneu, p. 123 – 150, 2002.

TORRENTE, Y. et al. Intra-arterial injection of muscle-derived CD-34⁺Sca-1⁺ stem cells restores dystrophin in *mdx* mice. **Journal of Cellular Biology**. v. 152, p. 335 – 48, 2001.

ZATZ, R. Proteinúria. In: ZATZ, R. **Fisiopatologia Renal**. Rio de Janeiro, 2^aed., Ed. Atheneu, p. 46 – 50, 2002.