

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

**IMPORTÂNCIA DOS MASTÓCITOS NA PATOGÊNESE
DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE EM CÃES
GOLDEN RETRIEVER**

Isabela Mancini Martins
Médica Veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

IMPORTÂNCIA DOS MASTÓCITOS NA PATOGÊNESE
DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE EM CÃES
GOLDEN RETRIEVER

Isabela Mancini Martins

Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Patologia Animal.

2015

Martins, Isabela Mancini
M386i Importância dos mastócitos na patogênese da distrofia muscular de
Duchenne em cães Golden Retriever / Isabela Mancini Martins. –
Jaboticabal, 2015
xiv, 38 f.: il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Julieta Engrácia Rodini de Moraes

Banca examinadora: Paula Fratini, Tais Harumi de Castro

Sasahara

Bibliografia

1. Mastócitos. 2. Distrofia. 3. Fibrose. 4. Golden Retriever. 5.
Histomorfometria. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.74-007.23:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Isabela Mancini Martins – Filha de Renata Mancini e Sidnei Neri Martins nasceu em 25 de março de 1990, em Araraquara, São Paulo, onde cursou na rede pública o ensino fundamental e médio, concluído em dezembro de 2007. Em 2009, após a aprovação do vestibular, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, onde se graduou em dezembro de 2013. Em março de 2014, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (mestrado), área de concentração Patologia Animal no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes, concluído sua dissertação em julho de 2015 e tendo sido aprovada no exame de qualificação em Patologia Animal no dia 26 de junho de 2015.

DEDICATÓRIA

À Deus por sempre me proteger em todos os momentos da minha caminhada.

À Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, por interceder nos momentos difíceis.

À minha família, minha mãe Renata, meu Pai Sidnei e meu irmão Raul. Muito obrigada por sempre estarem comigo, pelo apoio e amor. Amo vocês.

Aos meus familiares que torceram por mim.

Ao meu companheiro, amigo e confidente Marcos Pires de Souza. Sempre estive ao meu lado nos momentos bons e ruins. Te amo.

Às minhas amigas de longa caminhada Ana Paula Rennó e Estefani Marques da Silva Furioto, são as melhores do mundo. Aos meus amigos Lidiane, Rafael e Matheus, pelas risadas e momentos divertidos.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes por acreditar em mim e me proporcionar a oportunidade de trabalhar com a linha de pesquisa tão rica e inspiradora.

Ao Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes pelos ensinamentos em minhas dúvidas.

À Dra. Ligia Gomes Miyazato, que foi a pioneira na linha de pesquisa com o cão Golden Retriever distrófico. Exemplo de dedicação que resultou em várias dissertações e artigos.

Ao Prof. Dr. Rogério Salvador por me motivar e aconselhar a realizar o mestrado na Unesp, e, também pelas oportunidades cedidas na graduação. Sem isso não estaria aqui.

À Dra. Lygia Maria Mouri Malvestio, pelos ensinamentos, conselhos e pela paciência comigo. Muito Obrigada.

Aos meus colegas de laboratório: Fausto, Paulo, Gustavo, Marina, Thalita, Jefferson, Thiago, Silas e Dayanne, pela participação direta ou indireta no meu trabalho.

As amigas Elena, Mayara, Cláudia e Branca, pelas risadas.

À Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos, a Dra. Cibele Prado e a técnica Elaine Medeiros Floriano da USP de Ribeirão Preto, pelo auxílio no meu trabalho.

À Dra. Tais Harumi de Castro Sasahara, pela disponibilidade em me ajudar em vários momentos.

Ao Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, pelos ensinamentos e conselhos.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino e a Dra. Paula Fratini, pela oportunidade em conhecer o canil GRMD-Brasil na FMVZ-USP.

Aos técnicos do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV, Edgar, Theo, Francisca e a secretária Moema, pela contribuição ao meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal, em especial ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste estudo. Obrigada.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	O papel da distrofina no músculo	3
2.2	Lesão muscular no cão Golden Retriever distrófico	4
2.3	Terapias para DMD/GRMD	6
2.4	O papel dos mastócitos na DMD	9
3	OBJETIVO	11
4	MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1	Amostras e grupos	12
4.2	ESTUDO QUALITATIVO	14
4.2.1	Histopatologia	14
4.2.2	Coloração Azul de Toluidina	14
4.2.3	Coloração Tricrômio de Azan	14
4.3	ESTUDO QUANTITATIVO	15
4.3.1	Histomorfometria	15
4.3.2	Análise estatística	15
5	RESULTADOS	15
5.1	Estudo qualitativo das lesões	15
5.2	ESTUDO QUANTITATIVO	22
5.2.1	Histomorfometria	22
5.2.2	Morfometria de tecido fibro-colagenoso	25
6	DISCUSSÃO	28
7	CONCLUSÕES	31
8	REFERÊNCIAS	32

IMPORTÂNCIA DOS MASTÓCITOS NA PATOGÊNESE DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE EM CÃES GOLDEN RETRIEVER

RESUMO - O cão Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) é o melhor modelo natural da distrofia muscular de Duchenne (DMD) com manifestações genotípicas e fenotípicas semelhantes à doença humana. Como nos afetados pela DMD, a proliferação progressiva de tecido conectivo no endomísio das fibras musculares ocorre em paralelo ao curso clínico da doença nos animais GRMD. Estudos indicam a relação dos mastócitos com a deposição de tecido fibroso devido a liberação de seus mediadores que ativam os fibroblastos. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar a expressão dos mastócitos e sua possível relação com as lesões musculares e fibrose em cães GRMD de diferentes idades. Foram utilizados fragmentos de quatro grupos musculares esqueléticos (masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral) de dez cães entre dois a oito meses de idade sendo seis afetados e quatro controles. As amostras foram processadas por técnicas usuais de histologia, coradas com hematoxilina e eosina, azul de toluidina para verificar a expressão dos mastócitos e tricrômio de Azan para a evidenciação e quantificação da fibrose. Em todos os grupos musculares dos cães GRMD o infiltrado de mastócitos apresentou aumento significativo comparado ao grupo controle. O número médio de mastócitos diminuiu com a idade dos cães GRMD. Todos os grupos musculares apresentaram aumento significativo na quantidade de tecido colagenoso em relação ao grupo controle. A deposição de tecido fibroso diminuiu de acordo com a idade dos animais. Dos resultados afere-se que o aumento da degranulação dos mastócitos ocorreu em cães GRMD mais jovens (2 meses) fato que potencializou o aumento na deposição de tecido fibroso nas fibras musculares que foi diminuindo gradativamente com o tempo e a idade dos animais. Outros estudos são necessários para esclarecer o papel dos mastócitos na patogênese da fibrose, a fim de contribuir no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e melhorar a expectativa de vida de humanos e cães afetados pela distrofia muscular.

Palavras-chave: azul de toluidina, distrofina, fibrose, Golden Retriever, histomorfometria, mastócitos

IMPORTANCE OF MAST CELLS IN PATHOGENESIS OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY IN GOLDEN RETRIEVER DOGS

ABSTRACT - Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) is the best natural model of Duchenne muscular dystrophy (DMD) with genotypic and phenotypic manifestations similar the human disease. As in to DMD patients, the progressive proliferation of connective tissue in the endomysium of the muscle fibers is parallel to the clinical course of disease in GRMD animals. Studies indicate the relationship of mast cells with the deposition of fibrous tissue due to the release of mediators that activate fibroblasts. The aim of this study was to evaluate the expression of mast cells and its possible relation with muscle injury and fibrosis in GRMD dogs at different ages. It was used fragments of four skeletal muscle groups (masseter, diaphragm, triceps brachial and biceps femoris) of ten dogs between two and eight months age, six affected and four controls. Samples were processed by usual techniques of histology, stained with hematoxylin-eosin and toluidine blue, to verify the expression of mast cells, and Azan trichrome for evaluation and quantification of fibrous. In all muscle groups of dogs GRMD the infiltration of mast cells increased significantly compared to control group. The average number of mast cells decreased with the age of GRMD dogs. All muscle groups showed a significant increase in the amount of collagenous tissue in the control group. The deposition of fibrous tissue decreased with the age of the animals. Possibly, the increase of mast cell degranulation and mediator release would occur in younger GRMD dogs (2 months), fact that potentiated the increase deposition of fibrous tissue in muscle fibers which was gradually decreasing over time and age of the animals. Other studies are needed to clarify the role of mast cells in the pathogenesis of fibrosis in order to contribute to the development of new therapeutic approaches and improve the life expectancy of humans and dogs affected by muscular dystrophy.

Keywords: dystrophin, fibrosis, Golden Retriever, histomorphometry, mast cells, toluidine blue

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV9 – vetor associado ao adenovírus

bFGF – fator básico de crescimento de fibroblastos

Camundongos mdx- distrofia muscular com mutação no cromossomo X

CMV – citomegalovírus

CK – creatino quinase

DMD – Distrofia Muscular de Duchenne

GRMD – Golden Retriever Muscular Dystrophy

HE – hematoxilina-eosina

MHC I – complexo de maior histocompatibilidade de classe I

NGF – fator de crescimento neural

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fotomicrografia do músculo de animais controles com 2, 3 e 8 meses respectivamente. Fibras musculares uniformemente distribuídas com diâmetro regular. A. Masseter. B. Tríceps braquial. C. Bíceps femoral.....	17
Figura 2.	Fotomicrografia do músculo masseter de cães GRMD. A. Fragmento muscular de cão com 2 meses de idade. Miofibras com variação de diâmetro (*), presença de infiltrado inflamatório (seta). B. Fragmento muscular de cão com 3 meses de idade. Presença de tecido colagenoso no espaço perimisial e endomisial (seta). C. Fragmento muscular de cão com 5 meses de idade. Intensa deposição de células adiposas. D. Fragmento muscular de cão com 8 meses de idade. Moderada deposição de células adiposas.....	18
Figura 3.	Fotomicrografia do músculo tríceps braquial de cães GRMD. A. Fragmento muscular de cão com 2 meses de idade. Presença de mastócitos (seta) em áreas de fibrose e células adiposas. B. Fragmento muscular cão com 3 meses de idade. Presença de mastócitos (seta) em áreas de fibrose.....	19
Figura 3.	Fotomicrografia do músculo tríceps braquial de cães GRMD. C. Fragmento muscular de cão com 5 meses de idade. Presença de mastócitos (seta) em áreas de fibrose. D. Fragmento muscular de cão com 8 meses de idade. Presença de mastócitos (seta) no espaço endomisial.....	20

Figura 4.	Fotomicrografia do músculo bíceps femoral de cães GRMD. A. Fragmento muscular de cão com 2 meses de idade. Intensa deposição de tecido colagenoso (seta) no endomísio. B. Fragmento muscular de cão com 3 meses de idade. Intensa deposição de tecido colagenoso (seta) no endomísio. C. Fragmento muscular de cão com 5 meses de idade. Moderada deposição de fibrose (seta) no perimísio e endomísio. D. Fragmento muscular de cão com 8 meses de idade. Discreta deposição de tecido colagenoso (seta) no endomísio.....	21
Figura 5.	Morfometria dos mastócitos nos músculos masseter (M), diafragma (D), tríceps braquial (TB) e músculo bíceps femoral (BF) do grupo controle (C) e de cães GRMD com idade entre 2, 3, 5 e 8 meses respectivamente.....	24
Figura 6.	Morfometria de tecido colagenoso nos músculos masseter (M), diafragma (D), tríceps braquial (TB) e músculo bíceps femoral (BF) do grupo controle (C) e cães GRMD com idade entre 2, 3, 5 e 8 meses respectivamente.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Identificação de amostras musculares de controles e cães GRMD com idades entre 7 dias a 13 meses, pertencentes ao banco de fragmentos do laboratório de Patologia Experimental e Comparada da FCAV/Unesp.....	12
Tabela 2.	Valores médios (respectivos desvio padrão) e análise de variância para o número de mastócitos no masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães GRMD de 2, 3, 5 e 8 meses de idade.....	22
Tabela 3.	Valores médios (respectivos desvio padrão) e análise de variância para o número de mastócitos no masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães controle de 2, 3, 5 e 8 meses de idade.....	23
Tabela 4.	Valores médios (respectivos desvio padrão) e análise de variância para a deposição de tecido colagenoso no masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães GRMD de 2, 3, 5 e 8 meses de idade.....	25
Tabela 5.	Valores médios (respectivos desvio padrão) e análise de variância para a deposição de tecido colagenoso no masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães controle de 2, 3, 5 e 8 meses de idade.....	26

1 INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é doença degenerativa em humanos causada por mutação no gene da distrofina, afetando um em cada 3500 recém-nascidos vivos do sexo masculino. Trata-se de uma desordem genética recessiva localizada no braço curto do cromossomo X (Xp21) (HOFFMAN et al., 1987; WOOLF et al., 2006). O primeiro estágio da doença é caracterizado pela presença de grupos focais de fibras musculares necróticas e hipertrofia muscular. Posteriormente, ciclos repetidos de degeneração e regeneração esgotam a capacidade regenerativa das células-tronco musculares específicas (células satélites) e mecanismos de fibrose induzem a substituição progressiva do tecido muscular contrátil por tecido conectivo e adiposo (COLLINS; MORGAN 2003; DECONINCK; DAN 2007; MALVESTIO et al., 2015; MIYAZATO et al., 2011b).

A doença apresenta manifestações clínicas como fraqueza muscular de progressão relativamente rápida que se inicia antes dos cinco anos de idade atingindo os músculos da cintura pélvica e, em seguida, os da cintura escapular com pseudo-hipertrofia muscular da panturrilha, cifose, escoliose e dificuldade em deambular durante a primeira infância, levando os indivíduos afetados ao uso de cadeira de rodas por volta dos 14 anos de idade. A morte de pacientes com DMD ocorre geralmente entre a segunda e a terceira décadas de vida por complicações respiratórias e/ou cardíacas (EAGLE et al., 2002; GULATI et al., 2005; VAN BOCKEL, 2009).

O cão Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) é o melhor modelo natural da DMD com manifestações genotípicas e fenotípicas próximas da doença humana (COLLINS; MORGAN, 2003; COOPER et al., 1988). Semelhante aos portadores da DMD, a proliferação progressiva de tecido conectivo no endomísio das fibras musculares ocorre em paralelo ao curso clínico da doença nos animais GRMD (GOROSPE et al., 1994).

A ausência da distrofina pode ser detectada em várias espécies animais como cães, gatos, roedores, peixes e invertebrados. Apesar de apresentar fenótipos diferentes – o que deve estar relacionado com a resposta específica de cada espécie à ausência de distrofina – esses animais são usados como modelos naturais na busca de um tratamento eficiente das distrofinopatias do

homem (COLLINS; MORGAN, 2003). Em cães, mutações espontâneas no gene que codifica a distrofina foi inicialmente identificada na raça Golden Retriever (KORNEGAY et al., 1988), no German short-haired pointer (SCHATZBERG et al., 1999), no Rottweiler (COLLINS; MORGAN, 2003), no Beagle (SHIMATSU et al., 2003) e no Weimaraner (BALTZER et al., 2007).

Em camundongos, a distrofia muscular é reproduzida em animais com mutação no cromossomo X (mdx). Todavia, se comparado com a doença no homem, a disfunção muscular neste modelo animal apresenta menor intensidade e por isso não mimetiza o fenótipo da DMD humana (BULFIELD et al., 1984; COLLINS; MORGAN, 2003).

Em cães, as fêmeas portadoras apresentam apenas um cromossomo X afetado, podendo transmiti-lo à sua progênie, sendo mais frequente a existência de machos afetados. Uma vez, herdado o cromossomo X alterado invariavelmente os machos serão afetados. As fêmeas acometidas pela distrofia muscular necessariamente apresentam dois cromossomos X alterados, que na maioria das vezes acontece por mutação, devido ao fato de que o macho afetado não se reproduz em condições normais em virtude da extrema fraqueza muscular (ARAÚJO et al., 2009).

As principais manifestações clínicas em cães incluem: disfagia, atrofia dos músculos mastigatórios, hipertrofia dos músculos da língua, sialorréia, megaesôfago, hipertrofia do músculo diafragma e prejuízo progressivo na marcha em cães com 6 a 10 semanas de idade. Em consequência do enrijecimento dos membros pélvicos, podem ocorrer atrofia e hipertrofia muscular seletiva, desvio do eixo de membros, fraqueza muscular e contraturas (ARAÚJO et al., 2009; VALENTINE et al., 1988; VALENTINE, 1989).

Semelhante aos portadores da DMD, a insuficiência cardíaca constitui uma das principais causa mortis nos animais GRMD (VALENTINE, 1989). As alterações cardíacas são comuns, porém assintomáticas ao longo de um período variável de tempo, antes de ocorrer a cardiomiopatia dilatada resultante da fibrose (ARAÚJO et al., 2009; MALVESTIO et al., 2015). A cardiomiopatia hipertrófica pode ser detectada em todos os pacientes humanos acima de 18 anos de idade e classificada em pré-clínica, leve, moderada e severa (NIGRO et al., 1990). Como consequência à intensa fibrose miocárdica pode ocorrer a perda da contratilidade do músculo cardíaco, levando a

insuficiência cardíaca congestiva (VALENTINE et al., 1989; MALVESTIO et al., 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O papel da distrofina no músculo

A distrofina é uma proteína de 427 kDa, que integra o complexo distrofina glicoproteínas associadas (DGC) localizada logo abaixo do sarcolema, co-localizada com a β -espectrina e a vinculina, tendo a sua porção N-terminal ligada à actina e a porção C-terminal conectada à proteína transmembrana β -dystroglicana (ALLIKIAN; MCNALLY, 2007; LAPIDOS et al., 2004). Está presente na musculatura lisa, esquelética e cardíaca. Atua no importante papel do estabelecimento das conexões entre o meio intracelular, da actina citoesqueleto e/ou a estrutura sarcomérica e a membrana basal externa. As suas principais funções compreendem a estabilização da membrana durante os ciclos de contração e a transdução de força (LAPIDOS et al., 2004; TOWBIN, 1998).

Alguns estudos demonstraram que a distrofina e o DGC desempenham papel fundamental na proteção e estabilização da membrana plasmática contra o estresse mecânico induzido pela contração muscular (DANIALOU et al., 2001; LAPIDOS et al., 2004; RYBAKOVA et al., 2000). Além disso, os miócitos que perdem a distrofina são mais vulneráveis ao estresse mecânico imposto sobre a célula resultando na perda da integridade sarcolemal com progressiva degeneração miofibrilar (miocitólise) na musculatura esquelética e cardíaca (DANIALOU et al., 2001; KORNEGAY et al., 2012).

Na DMD, a ausência da distrofina nas células musculares desencadeia mecanismos compensatórios como o aumento da expressão de proteínas estruturais visando a manutenção da estabilidade da membrana celular durante a contração (HELLIWELL et al., 1992). Nesse sentido, aumento na expressão sarcolemal da utrofina, proteína homóloga e estruturalmente muito similar à distrofina (73% de sequência de aminoácidos homólogos), foi documentado em pacientes com DMD (HELLIWELL et al., 1992; KLEOPA et al., 2006), em

animais GRMD (LANFOSSI et al., 1999) e em modelo murino mdx (MATSUMURA et al., 1992).

O aumento na expressão endógena da utrofina foi documentado em animais GRMD, todavia essa não parece ser eficiente para reconstruir a ligação com o complexo DGC, uma vez que o modelo animal apresenta graves lesões musculares e cardíacas semelhante aos acometidos pela DMD (BERETTA et al., 2014; LANFAROSSO et al., 1999; MALVESTIO et al., 2015).

2.2 Lesão muscular no cão Golden Retriever distrófico

A GRMD é caracterizada por fraqueza muscular progressiva e atrofia. Estas características são semelhantes às da DMD humana (NAKAMURA; TAKEDA, 2011). Níveis extremamente elevados de creatino quinase (CK) são identificados nos primeiros dias de vida e atingem o máximo em 6-8 semanas após o nascimento, antes mesmo do aparecimento dos primeiros sinais clínicos, sugerindo que o início das lesões poderia ocorrer ainda no útero o que permitiria o diagnóstico precoce da doença (COLLINS; MORGAN, 2003; MERLINI; SABATELLI, 2015; NGUYEN et al., 2002; VALENTINE et al., 1988). Os níveis de CK permanecem elevados durante o estágio avançado da doença indicando necrose persistente da fibra muscular. Declínio progressivo em seus níveis é observado em cães de 3,5 a 6 anos de idade, semelhante ao observado em pacientes com DMD (VALENTINE et al., 1988). Os cães que sobrevivem durante o período neonatal apresentaram ondas de degeneração e necrose musculares com regeneração inicial suficiente para compensar a degeneração das fibras (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008; MIYAZATO et al., 2011b; NGUYEN et al., 2002; VALENTINE et al., 1990).

A patogênese da distrofia muscular é caracterizada por duas fases: a fase I que envolve os efeitos diretos da deficiência de distrofina e a fase II relacionada à fibrose do endomísio e atrofia muscular (HOFFMAN; GOROSPE, 1991; MORAES et al., 2015; NGUYEN et al., 2002). Lesões da fase I são relatadas em todas as espécies com ausência de distrofina e caracterizam-se por hialinização, hipertrofia, acúmulo intracelular de sais de cálcio e necrose com subsequente regeneração de miofibras para compensar a degeneração,

além de grande resposta inflamatória (MIYAZATO et al., 2011a; MIYAZATO et al., 2011b; MORAES et al., 2015; NGUYEN et al., 2002). As lesões da fase II podem ser observadas em cães GRMD aos 2 meses de idade. Estas lesões consistem principalmente no aumento do tecido conectivo no endomísio caracterizando a fibrose endomisial e substituição de fibras musculares por tecido fibroso e células adiposas. Além disso, marcada atrofia muscular, focos de miofibras completamente mineralizadas e heterogeneidade no diâmetro das fibras também são observadas em músculos na fase II da doença. Somente crianças com DMD, cães GRMD e músculo diafragma de camundongos mdx apresentam esta fase da doença. Ademais, o cão GRMD é o único modelo animal que demonstra precocemente por volta de dois meses de idade, desenvolvimento generalizado das lesões secundárias pela deficiência de distrofina de um modo compatível com meninos afetados pela DMD (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008; LESSA et al., 2014a; NGUYEN et al., 2002). Os principais achados ultraestruturais em cães GRMD incluem dilatação do retículo sarcoplasmático, fibras hipercontraídas, necrose, degeneração de áreas subsarcolemas e desorganização citoplasmática (VALENTINE et al., 1990).

Estudo envolvendo 16 cães machos Golden Retriever afetados pela distrofia muscular com idades entre 5 a 51 meses mostrou na análise histopatológica presença de hialinização e necrose das fibras musculares bem como aumento das células inflamatórias, particularmente as mononucleares (MIYAZATO et al., 2011b). Além disso, foram observadas variações no tamanho das fibras, calcificação distrófica, regeneração das fibras de menor diâmetro e infiltração de células adiposas em áreas interfasciculares. Verificou-se ainda, aumento significativo no número de fibras positivas para a deposição de cálcio na musculatura esquelética desses cães, sugerindo que a ruptura da homeostase do cálcio poderia estar associada com as lesões degenerativas severas observadas nesses animais (MIYAZATO et al. 2011a). A avaliação histológica das fibras musculares esqueléticas de cães GRMD evidenciou irregularidade na forma e perda do padrão em mosaico entre os diferentes tipos de fibras musculares. Ainda neste estudo, observou-se o envolvimento cardíaco com pronunciadas lesões em 87,5% dos cães GRMD analisados. As análises do músculo cardíaco desses cães distróficos revelaram aumento na

deposição de tecido conectivo, presença de células inflamatórias, necrose e algumas fibras com calcificação distrófica (MIYAZATO et al. 2011a).

Estudo histopatológico, bioquímico e imunológico realizado no músculo gastrocnêmio e junção miotendínea de animais GRMD revelou alterações semelhantes às observadas nos humanos acometidos pela distrofia muscular, tais como: fibrose, hialinização, hipertrofia, necrose, calcificação e regeneração. Entretanto, a morfologia das lesões nas junções miotendíneas foram mais acentuadas do que as do músculo gastrocnêmio, caracterizada pelo aumento da fibra do Tipo II, diminuição da expressão do complexo de maior histocompatibilidade de classe I (MHC I) e menor atividade citotóxica das células CD8. Tais resultados sugerem fortemente a ação do sistema imunológico no processo inflamatório na distrofia muscular do Golden Retriever (BERETTA et al., 2014).

Recentemente estudo de nosso laboratório com animais GRMD com idade entre 5 a 51 meses de idade, demonstrou que os cães apresentaram grandes áreas do ventrículo esquerdo e direito com deposição de tecido fibroso e adiposo, fato este que poderia comprometer o correto funcionamento do coração e possivelmente progredir à insuficiência cardíaca. No mesmo estudo foi encontrado pela primeira vez as células de Anitschkow (células indiferenciadas) nos corações dos cães GRMD, antes apenas encontradas na doença cardíaca reumática em humanos (MALVESTIO et al., 2015).

2.3 Terapias para DMD/GRMD

Atualmente existem técnicas diagnósticas bem estabelecidas para a DMD, porém nenhum tratamento efetivo foi desenvolvido para esta doença. O surgimento de novas terapias possibilita a busca de diferentes estratégias no tratamento da doença (MORAES et al., 2015).

As estratégias terapêuticas utilizadas para a DMD podem ser categorizadas como farmacológica, celular ou mesmo a associação delas. As terapias farmacológicas visam controlar os mecanismos patogênicos buscando amenizar o fenótipo distrófico da doença. As duas abordagens moleculares mais comuns são a terapia gênica, na qual o gene da distrofina é introduzido

no músculo por injeção local ou através da vasculatura usando plasmídios ou vetores virais e a correção genética que envolve a introdução de oligonucleotídeos para restabelecer a sequência correta de nucleotídeos (KORNEGAY et al., 2012). A terapia celular através do transplante de células normais como os mioblastos, ou células-tronco visa estabelecer fibras musculares saudáveis no músculo doente a fim de amenizar o processo distrófico (MORAES et al., 2015; KORNEGAY et al., 2012).

Atualmente, os corticosteroides são o tratamento mais utilizado para a fraqueza muscular em pacientes com DMD, principalmente em crianças ambulantes. Vários estudos demonstraram a eficácia da terapia com corticoides em retardar a perda da independência, a deambulação autônoma e a manutenção da função pulmonar (MERLINI; SABATELLI, 2015). Outro estudo, estudou a correlação entre o tratamento com corticosteroide (prednisona e deflazacorte) e o tempo de perda da mobilidade em 477 pacientes com DMD. Foi verificado, que os pacientes que receberam tratamento com corticosteroide em longo prazo obtiveram resultados positivos com 82% menor risco de perda da deambulação (KIM et al., 2015).

Muitos estudos foram desenvolvidos em cães GRMD para avaliar o papel das terapias farmacológicas para o tratamento da DMD. Foram avaliadas alterações funcionais e histopatológicas em cães GRMD submetidos à administração oral diária do corticóide prednisona por 4 meses (LIU et al., 2004). Os resultados mostraram hipertrofia do músculo sartório cranial e melhora da angulação da articulação tíbio-társica, aumento da calcificação das miofibras e diminuição da expressão da miosina fetal, achados esses que mostraram os benefícios, mas também alterações histopatológicas deletérias após o tratamento com prednisona a esses animais (LIU et al., 2004; MORAES et al., 2015).

A combinação terapêutica entre a ciclosporina A e a prednisolona em níveis imunossupressores no percurso da doença de cães GRMD foi avaliada (BARTHÉLÉMY et al., 2012). Os resultados demonstraram intenso efeito sobre o fenótipo GRMD após o tratamento, conduzindo à exacerbação das lesões de calcificação e atrofia além da diminuição da força muscular e aumento da fadiga. Todavia, verificou-se surpreendente melhora na progressão das manifestações sistêmicas e na locomoção dos animais como também

diminuição dos valores de CK. Este fato salienta a importância do estudo no modelo canino na DMD (BARTHÉLÉMY et al., 2012; MORAES et al., 2015). Outro estudo sugeriu, para que o tratamento imunossupressor efetivo seja em cães a dose de ciclosporina A deve ser no decorrer do tratamento, orientado pelos valores séricos e idade dos animais (MORINI et al., 2008).

Estudo com terapia gênica indicou que cães GRMD que receberam injeções no músculo com o mini-gene da distrofina expressaram marcações positivas para essa proteína 14 dias após o tratamento. Por outro lado, dois dos seis cães inoculados com o gene completo apresentaram fortes marcações para distrofina aos 10 dias após a injeção, contudo não foi observada melhora clínica nos cães afetados (HOWELL et al., 1997; HOWELL et al., 1998; MORAES et al., 2015). Outro estudo com terapia gênica demonstrou que cães GRMD com 4 dias de idade que receberam a injeção intravenosa de um vetor associado ao adenovírus (AAV9) carreando um códon humano com o mini-gene da distrofina sob o controle do citomegalovírus (CMV), apresentaram expressão muscular generalizada do transgene após 16 semanas de tratamento, porém sem resultados clínicos satisfatórios (KORNEGAY et al., 2010; MORAES et al., 2015).

Em relação às terapias celulares, é sabido que as células fetais e as células-troncos embrionárias podem contribuir para a regeneração do músculo doente (KORNEGAY et al., 2012; MORAES et al., 2015). Estudo verificou que o transplante de mioblastos caninos mostrou-se incapaz de alcançar significativa implantação em cães GRMD (KORNEGAY et al., 2012). Por outro lado, o transplante de mesangioblastos (células-tronco associadas a vasos) em cães GRMD resultou em grande recuperação da expressão da distrofina e no restabelecimento da morfologia e função muscular (confirmado pela mensuração da força de contração das fibras individuais) que possibilitou notável melhora clínica e preservação da atividade motora (SAMPAOLESI et al., 2006). Outro estudo, avaliando as células-tronco imaturas da polpa dental de humanos (hIDPSC) transplantado por injeção arterial ou muscular em quatro cães GRMD, evidenciou mínima expressão da distrofina nos animais tratados. No entanto, melhora do quadro clínico foi observado nos animais que receberam injeções arteriais mensais, sugerindo que múltiplos fornecimentos

sistêmicos seriam mais eficazes do que as injeções locais (KERKIS et al., 2008).

Apesar do progresso de diversas abordagens terapêuticas, a DMD possui altas taxas de mortalidades. Possivelmente, esta falha seria explicada porque a maioria das pesquisas ainda são realizadas em modelos murinos que não reproduzem de forma fidedigna a patologia da doença. Portanto, os animais GRD são extremamente úteis para melhor compressão dos mecanismos patológicos e estudos pré-clínicos de terapias recentemente desenvolvidas utilizando as do tipo farmacológicas bem como as genéticas e as baseadas em células, no intuito de buscar a cura ou aumento na expectativa de vida aos acometidos pela DMD (MALVESTIO et al., 2015).

2.4 O papel dos mastócitos na DMD

Em condições normais do músculo esquelético, o dano causado pela força contrátil é seguido da resposta inflamatória que desaparece após alguns dias. Esta resposta transitória é uma reação homeostática normal à injúria que induz reparação muscular. Embora a mutação na distrofina represente a causa principal na DMD, são os processos secundários que envolvem a inflamação crônica, degeneração muscular e necrose que agravam a progressão da doença (ABDEL-SALAM, 2009).

Nos pacientes com DMD há resposta inflamatória persistente nos músculos esqueléticos com a invasão de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, que secretam citocinas e mediadores químicos (GROUNDS; TORRISI, 2004). Os neutrófilos constituem umas das primeiras células inflamatórias que interagem com o tecido distrófico e com isso números elevados destas células são observados nas primeiras horas após a lesão inicial. No entanto, os neutrófilos são células de curta duração, cujo número diminui rapidamente sendo pouco detectáveis 3 a 4 dias após a lesão (HODGETTS et al., 2006).

Neste sentido, a presença dos macrófagos é constante tanto na injúria aguda (lise das miofibras) como nas fases mais tardias (regeneração muscular) no músculo quadríceps de camundongos mdx (TIDBALL; WEHLING-

HENRICKS, 2004). Ademais, foi sugerido que os mastócitos são capazes de iniciar e modular o recrutamento de neutrófilos e macrófagos em resposta à injúria muscular (DUMONT et al., 2007).

Os mastócitos são células que derivam de células-tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea e migram para os tecidos periféricos como células imaturas e passam por diferenciação *in situ*. São encontrados em tecidos vascularizados, tais como mucosas e epitélios, sendo particularmente abundantes na pele, no trato respiratório e gastrointestinal e principalmente próximos aos vasos sanguíneos. Por esta razão, são umas das primeiras células inflamatórias susceptíveis à injúria (ABBAS, 2008; FRENZEL; HERMINE, 2013; REBER; FROSSARD, 2014). Os mastócitos variam em sua forma, possuem núcleos redondos e no citoplasma contém grânulos ligados à membrana e corpos lipídicos. Os grânulos contém proteoglicanos ácidos que se ligam aos corantes básicos (ABBAS, 2008). Foi relatado que meninos afetados pela DMD de 3 a 5 anos de idade, apresentam a primeira manifestação clínica da deficiência de distrofina no mesmo período em que ocorre aumento significativo do número de mastócitos nos músculos afetados, sugerindo a participação dessas células na patogênese da DMD (GOROSPE et al., 1994).

A ativação dos mastócitos ocorre por uma série de agentes físicos (trauma mecânico, calor, frio e irradiação) e compostos químicos (enzimas, polissacarídeos, lectinas, anafilatoxinas, compostos básicos e Ca^{2+}) que induzem a liberação de várias moléculas contidas no citoplasma em um processo conhecido como degranulação. As principais moléculas dos grânulos são histamina, serotonina, proteases (triptase, quimase, carboxipeptidase), mediadores de lipídios (prostaglandinas), citocinas, quimiocinas e as espécies reativas de oxigênio. Estas moléculas agem em vários sítios, aumentam a permeabilidade do epitélio e endotélio, estimulam a angiogênese, induzem a contração do músculo liso, ativam o recrutamento de neutrófilos e macrófagos e estimulam os fibroblastos a produzirem colágeno (ABBAS, 2008; ABDEL-SALAM, 2009; FRENZEL; HERMINE, 2013; GOROSPE et al., 1994).

Os mastócitos são conhecidos por promoverem a proliferação de fibroblastos, porém este mecanismo não foi completamente elucidado. A triptase é a protease mais abundante encontrada nos mastócitos, que pode

compreender até 25% do peso seco destas células. Além disso, a triptase não só é conhecida por degradar substratos no meio extracelular, mas sim por ativar o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), um potente promotor de fibrose, ou por estimular diretamente os fibroblastos (GOROSPE et al., 1994; RUOSS et al., 1991). Mesmo em baixas concentrações, a triptase estimula significativamente a mitogênese de fibroblastos *in vitro* (RUOSS et al., 1991).

Os mastócitos são conhecidos por possuírem sensores *in situ* de anormalidades do tecido e por estarem envolvidos nos mecanismos de reparação de feridas e destruição tecidual. Dessa forma, o extravasamento do conteúdo citoplasmático da miofibra causada pela deficiência de distrofina atuaria como estímulo para o recrutamento de mastócitos. Foi sugerido que o acúmulo e a degranulação dos mastócitos poderia causar a necrose e a progressão da fibrose levando assim a regeneração muscular incompleta (GOROSPE et al., 1994; NAHIRNEY et al., 1997). Neste contexto, foi observado aumento no número de mastócitos no músculo fibular longo de pacientes DMD, além de cães GRMD e de camundongos mdx pela técnica de imunofluorescência em comparação ao grupo controle (não afetados) (GOROSPE et al., 1994). Outro estudo verificou que camundongos mdx que receberam injeções intraperitoneais de cromoglicato dissódico (agente estabilizador de mastócitos) por 15 dias apresentaram redução na mionecrose nos músculos esternocleidomastoideu, tibial anterior e diafragma (MARQUES et al., 2008). Além disso, injeções intramusculares de grânulos de mastócitos purificados em camundongos mdx causaram danos extensos localizados nos músculos deficientes de distrofina, fato este não observado nos músculos de animais controles. Portanto, não só o músculo distrófico contém maior número de mastócitos, mas também possui elevada sensibilidade aos seus produtos (GRANCHELLI, 1995).

3 OBJETIVO

O objetivo da presente pesquisa foi o de avaliar a expressão dos mastócitos e sua possível relação com as lesões histopatológicas em quatro

grupos musculares esqueléticos (masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral) de cães Golden Retriever de 2 a 8 meses de idade afetados pela distrofia muscular buscando estabelecer uma inter-relação dessas células inflamatórias com a patogênese da fibrose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras e grupos

A escolha dos grupos musculares foi baseada no estudo prévio do nosso laboratório com músculos distróficos de Golden Retriever em que os quatro grupos musculares supracitados foram apontados como os mais degenerados (MIYAZATO, 2010).

Foram utilizados fragmentos de quatro grupos musculares esqueléticos (músculo masseter, diafragma, músculo tríceps braquial e músculo bíceps femoral) de 6 cães GRMD de 2 a 8 meses de idade, provenientes do banco de fragmentos do laboratório de Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia Animal da FCAV/Unesp (Tabela 1). Quatro animais de 2, 3, 5 e 8 meses e negativos para a doença do mesmo banco de fragmentos foram utilizados como controle. Todos os procedimentos histopatológicos foram realizados de acordo com Luna, 1968.

Tabela 1.

Identificação, idade e sexo de amostras musculares de controles e cães GRMD com idades entre 7 dias a 13 meses, pertencentes ao banco de fragmentos do laboratório de Patologia Experimental e Comparada da FCAV/Unesp.

Animal	Idade	Sexo
Controle	7 dias	Macho
Controle	2 meses	Macho
Controle	3 meses	Macho
Controle	5 meses	Macho
Controle	8 meses	Macho
Controle	13 meses	Macho
Afetado 1	7 dias	Macho
Afetado 2	2 meses	Macho
Afetado 3	2 meses	Macho
Afetado 4	3 meses	Macho
Afetado 5	5 meses	Macho
Afetado 6	7 meses	Macho
Afetado 7	8 meses	Macho
Afetado 8	8 meses	Macho
Afetado 9	11 meses	Macho
Afetado 10	13 meses	Macho

Este trabalho cumpriu os princípios éticos na experimentação animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, FCAV- Campus de Jaboticabal, (protocolo 01465/15).

4.2 ESTUDO QUALITATIVO

4.2.1 Histopatologia

Fragmentos da musculatura esquelética de animais GRMD de 2 a 8 meses de idade foram incluídos em parafina e cortados ao micrótomo em secções de 3 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE) pelo aparelho corador automático Belatrix (EasyPath[®], São Paulo-SP) azul de toluidina e tricrômio de Azan, com a finalidade de avaliar a presença de mastócitos e do infiltrado fibroso nos grupos musculares por microscopia de luz convencional.

4.2.2 Coloração Azul de Toluidina

As lâminas com cortes parafinados foram mantidas em estufa a 60°C por 45 minutos e, em seguida, passaram por desparafinização em xilol e hidratação em concentrações decrescentes de etanol. Após lavagem com água destilada as lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,1% (MERCK[®], Darmstadt-Alemanha) por 15 segundos.

4.2.3 Coloração Tricrômio de Azan

A desparafinização e hidratação foram semelhantes à coloração anterior. Seguiu-se à imersão das lâminas no corante azocarmim (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis-USA) em estufa a 60°C por 30 minutos. Após lavagem com água destilada foram imersas em óleo de anilina a 5% por 30 segundos. Em seguida, foram no ácido acético e posteriormente em solução alcóolica a 10% por um minuto. As lâminas foram transferidas para um recipiente de vidro com ácido fosfotúngstico a 5% em solução aquosa por uma hora. Após imersão com água destilada por 5 minutos, as lâminas foram contra coradas com azul de anilina (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis-USA) por 23 minutos e imersas no álcool a 95%.

4.3 ESTUDO QUANTITATIVO

4.3.1 Histomorfometria

O estudo histomorfométrico de contagem de mastócitos e quantificação de fibras colágenas foi realizado em todos os grupos musculares de afetados e controles, totalizando 40 lâminas para a leitura.

A quantificação dos mastócitos foi realizada em movimentos de "zig-zague" por toda extensão dos fragmentos e quantificados pelo numerador automático sequencial KW-trio[®], no microscópio de luz Primo Star Zeiss[®] (aumento de 40x).

A quantificação das fibras colágenas foi realizada em 10 campos aleatórios (aumento de 40x) dos fragmentos musculares de acordo com Prado et al. (2012), no microscópio de luz Leica[®] DMR (câmera DFC 290), mensurado pelo software Leica[®] Qwin V3.

4.3.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov e Smirnov. Comparações múltiplas foram feitas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Foi admitido o valor de $p < 0,05$. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo qualitativo das lesões

Os fragmentos musculares dos cães controle apresentaram características musculares normais, com presença de fibras musculares

uniformemente distribuídas com diâmetro regular, formato poliédrico envolvido por tecido conectivo e núcleos periféricos (Figuras 1A, 1B e 1C).

Os músculos masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral dos cães distróficos de 2 a 8 meses de idade apresentaram lesões distintas de intensidades variadas. A coloração de HE possibilitou evidenciar lesões degenerativas e alternância entre atrofia e hipertrofia das fibras em todos os músculos avaliados. A necrose foi mais frequente no diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral e rara no masseter, enquanto a hialinização foi mais frequente nos músculos masseter, diafragma e tríceps braquial e rara no músculo bíceps femoral.

O infiltrado inflamatório de células mononucleares distribuído pelo interstício ou margeando os fascículos apresentou-se mais frequente nos músculos tríceps braquial e bíceps femoral e no músculo masseter (Figura 2A) ao contrário do diafragma. A infiltração de células adiposas interfasciculares e fibrose intersticial foram achados constantes em todos os grupos musculares distróficos (Figuras 2C e 2D).

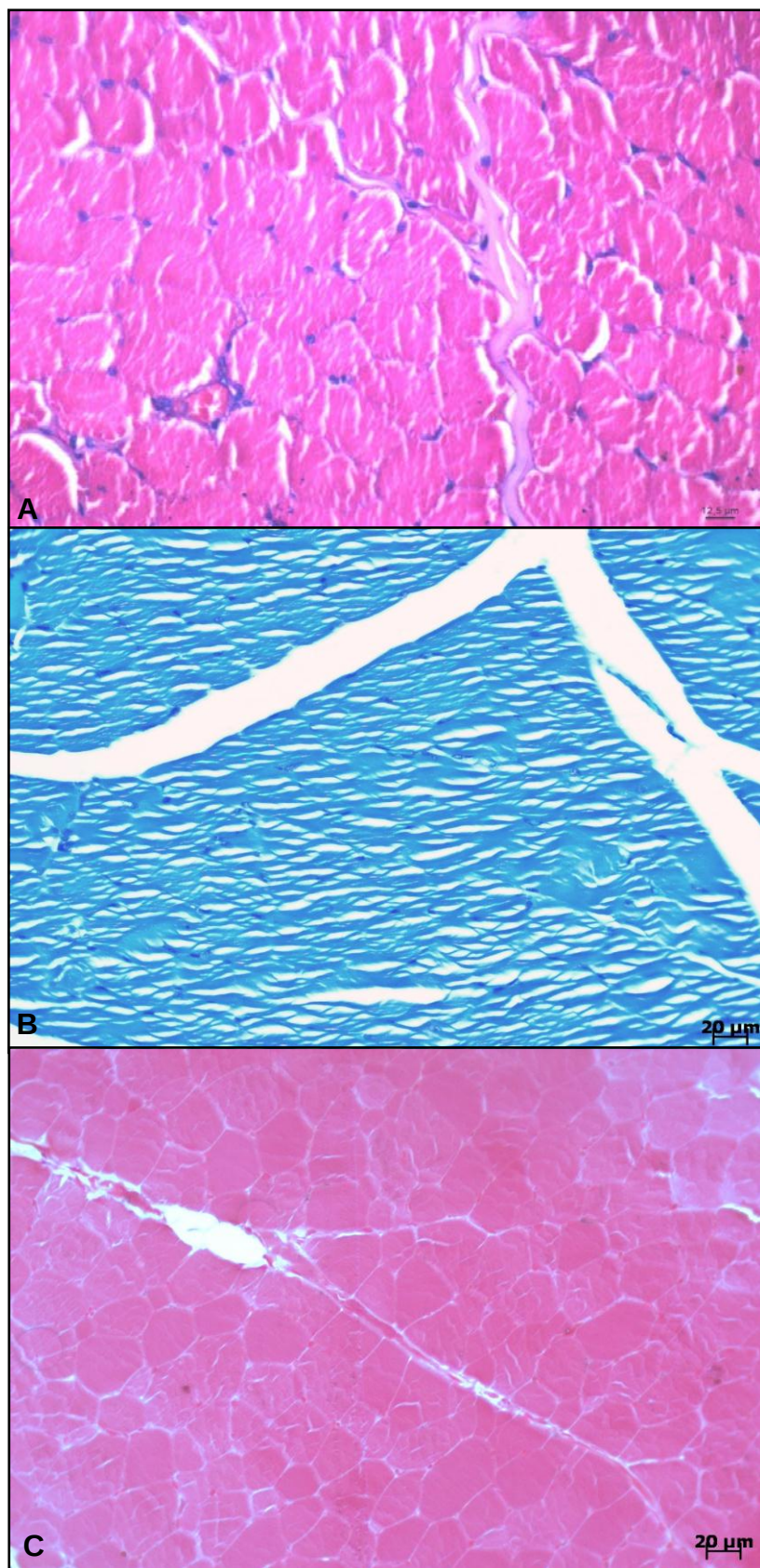


Figura 1. Fotomicrografia do músculo de animais controles com 2, 3 e 8 meses respectivamente. Fibras musculares uniformemente distribuídas com diâmetro regular. **A.** Masseter. **B.** Tríceps braquial. **C.** Bíceps femoral.

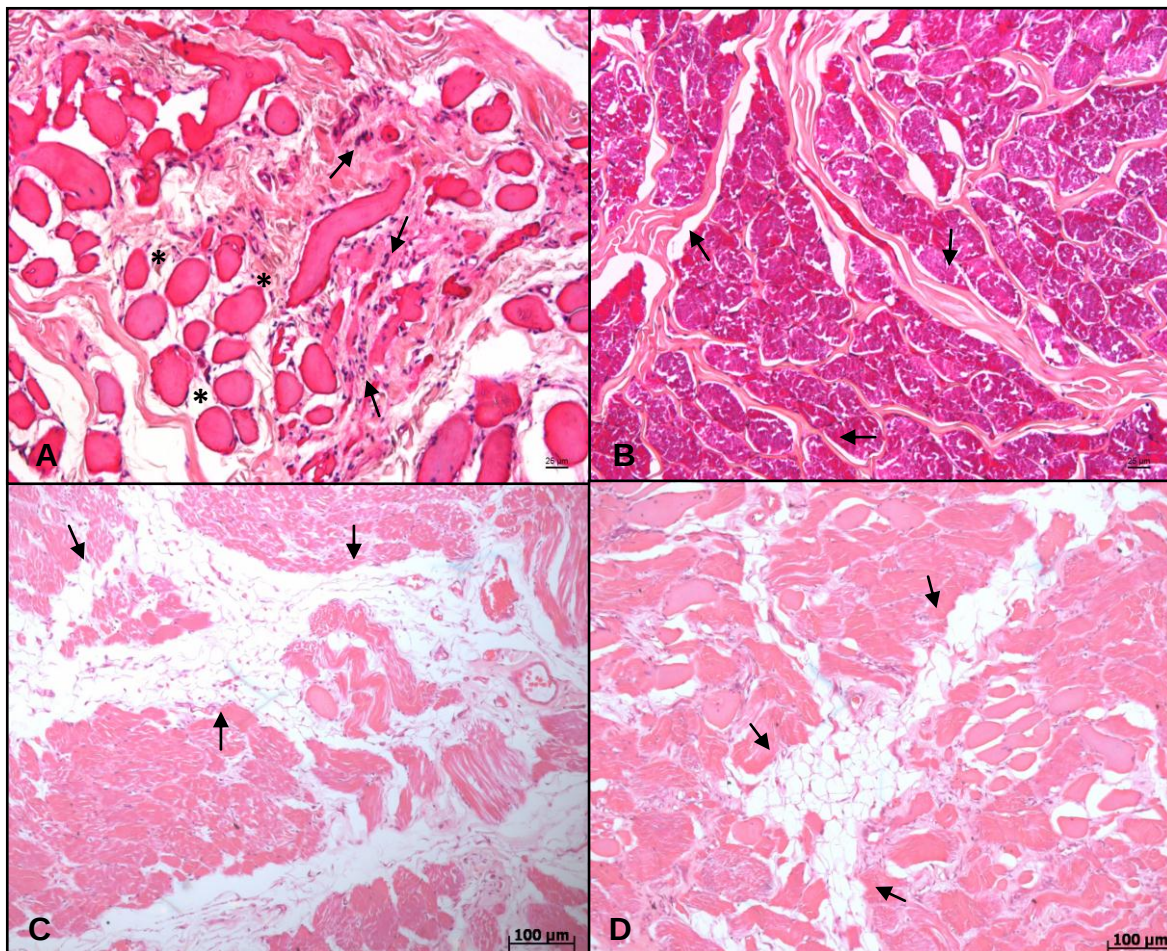


Figura 2. Fotomicrografia do músculo masseter de cães GRMD. **A.** Fragmento muscular de cão com 2 meses de idade. Miofibras com variação de diâmetro (*), presença de infiltrado inflamatório (seta). **B.** Fragmento muscular de cão com 3 meses de idade. Presença de tecido colagenoso no espaço perimisial e endomisial (seta). **C.** Fragmento muscular de cão com 5 meses de idade. Intensa deposição de células adiposas. **D.** Fragmento muscular de cão com 8 meses de idade. Moderada deposição de células adiposas.

A coloração de azul de toluidina revelou que a distribuição dos mastócitos nos músculos masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral ocorreu predominantemente em áreas de fibrose, sendo estas ao redor de arteríolas e vênulas e no interior do espaço endomisial (Figura 3).

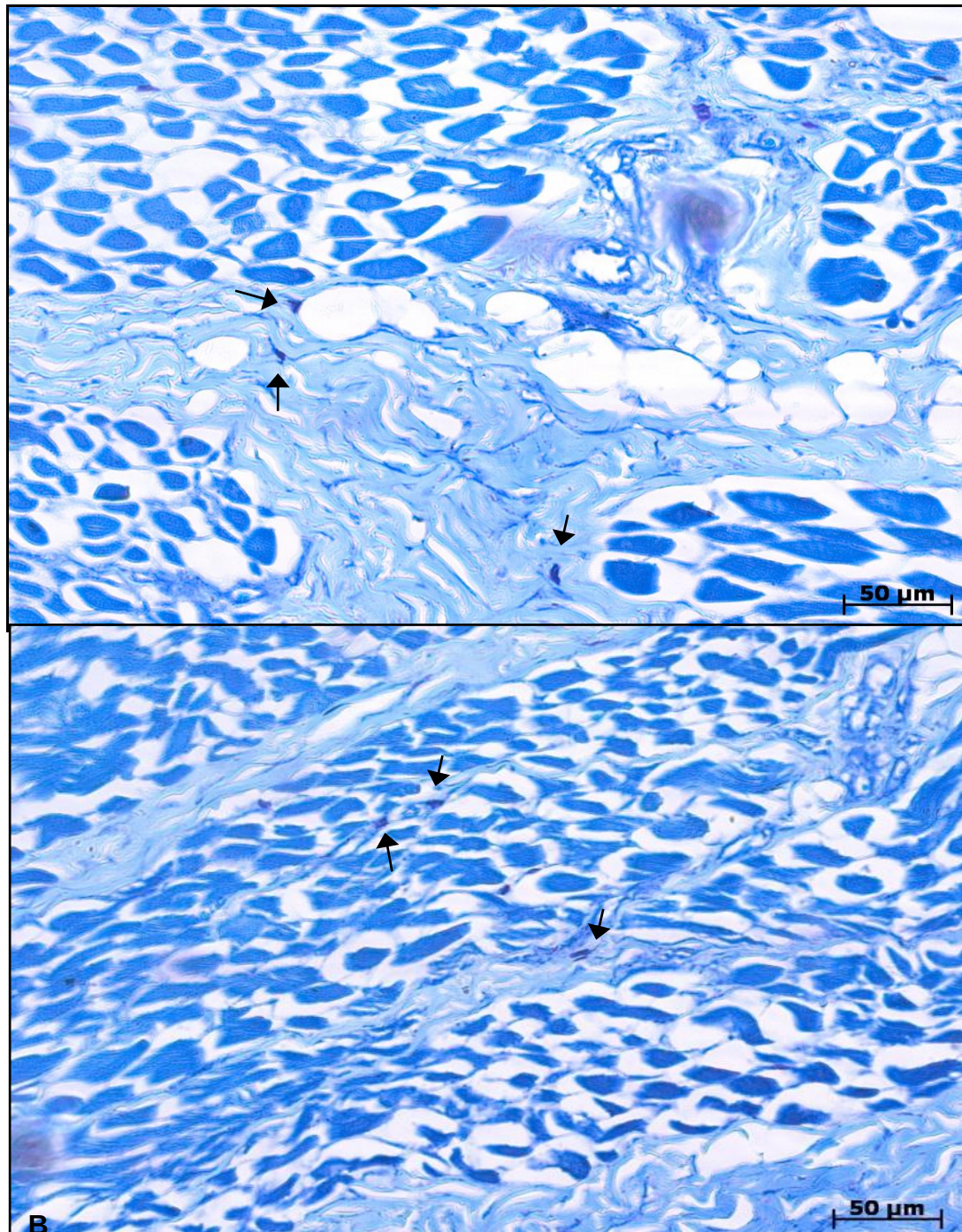


Figura 3. Fotomicrografia do músculo tríceps braquial de cães GRMD. **A.** Fragmento muscular de cão com 2 meses de idade. Presença de mastócitos (seta) em áreas de fibrose e células adiposas. **B.** Fragmento muscular cão com 3 meses de idade. Presença de mastócitos (seta) em áreas de fibrose.

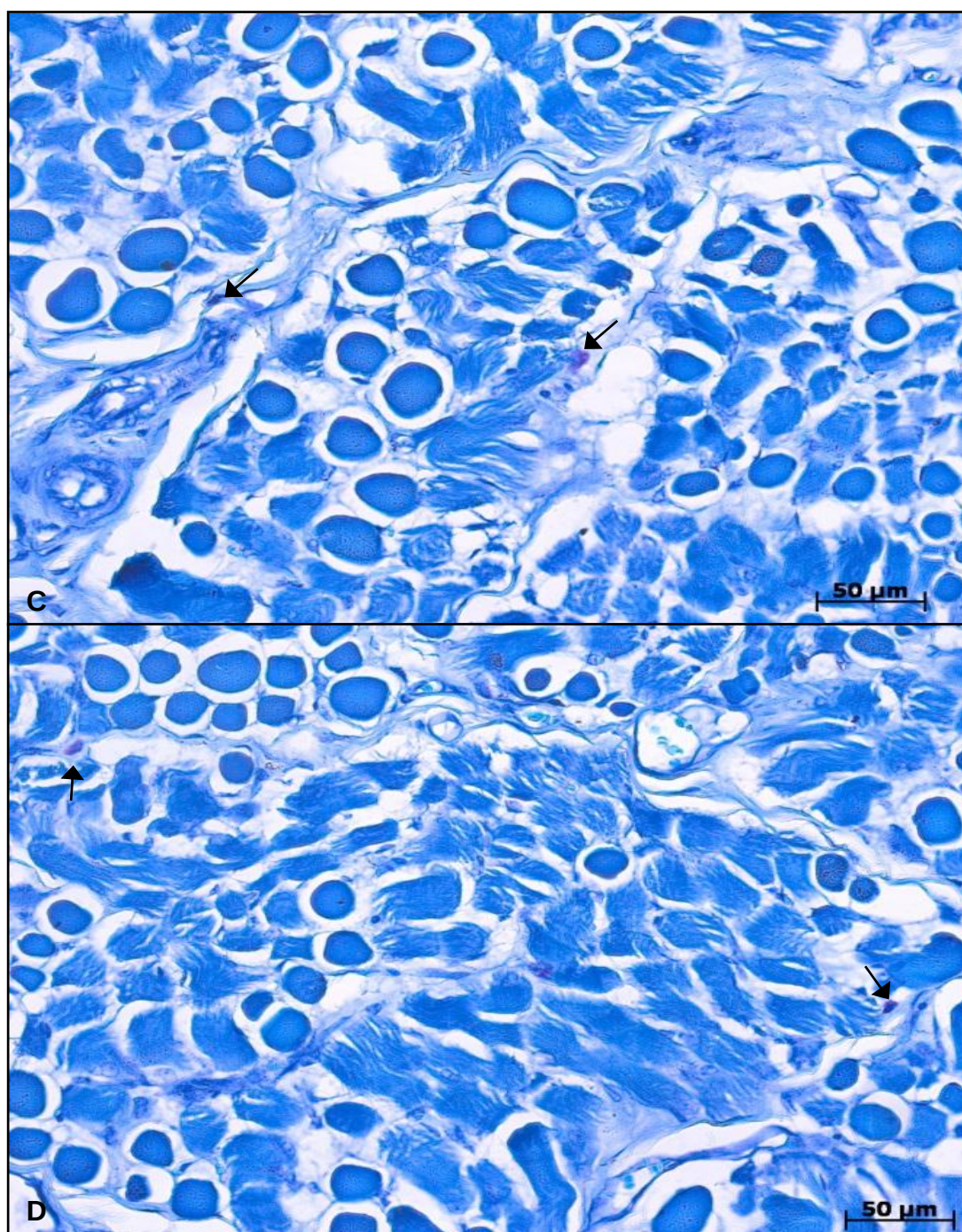


Figura 3. Fotomicrografia do músculo tríceps braquial de cães GRMD. **C.** Fragmento muscular de cão com 5 meses de idade. Presença de mastócitos (seta) em áreas de fibrose. **D.** Fragmento muscular de cão com 8 meses de idade. Presença de mastócitos (seta) no espaço endomisial.

A coloração de tricrômio de Azan evidenciou a deposição de tecido colagenoso (azul) nos músculos masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral. O tecido fibroso ocupou principalmente o perimísio e endomísio da musculatura esquelética dos cães GRMD (Figura 4).

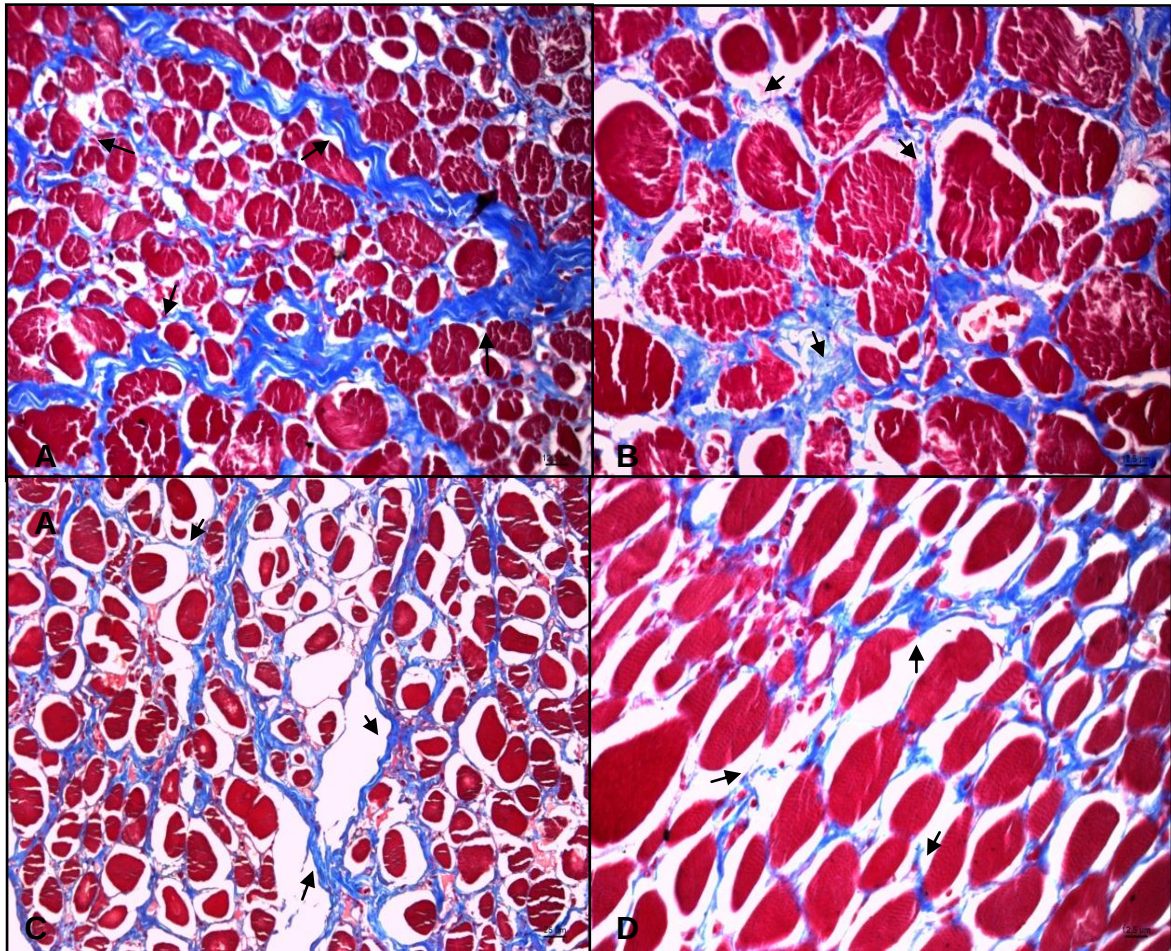


Figura 4. Fotomicrografia do músculo bíceps femoral de cães GRMD. **A.** Fragmento muscular de cão com 2 meses de idade. Intensa deposição de tecido colagenoso (seta) no endomísio. **B.** Fragmento muscular de cão com 3 meses de idade. Intensa deposição de tecido colagenoso (seta) no endomísio. **C.** Fragmento muscular de cão com 5 meses de idade. Moderada deposição de fibrose (seta) no perimísio e endomísio. **D.** Fragmento muscular de cão com 8 meses de idade. Discreta deposição de tecido colagenoso (seta) no endomísio.

5.2 ESTUDO QUANTITATIVO

5.2.1 Histomorfometria

Das 40 amostras analisadas o grupo muscular que apresentou o maior número médio de mastócitos foi o do tríceps braquial, seguido do músculo bíceps femoral, e músculo masseter ($p < 0,05$). O menor número foi observado no músculo diafragma ($p < 0,05$). A concentração de mastócitos nos grupos musculares dos animais afetados variou em relação à faixa etária de 2 a 8 meses. Em todos os grupos musculares a idade de 2 meses apresentou o maior número de mastócitos ao contrário dos animais com 8 meses (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2

Valores médios¹ (respectivos desvio padrão) e análise de variância para o número de mastócitos no masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães GRMD de 2, 3, 5 e 8 meses de idade.

Músculos	2 meses	3 meses	5 meses	8 meses
Masseter	368±7,043 ^A	338±2,366 ^{AC}	351,3±8,595 ^{BC}	330±10,10 ^B
Diafragma	157,3±6,976 ^A	139±2,683 ^B	140,3±1,862 ^{AB}	129,5±4,848 ^C
Tríceps braquial	761,3±9,606 ^A	736,3±2,251 ^B	722,3±1,366 ^B	671,5±18,37 ^C
Bíceps femoral	575,7±6,348 ^A	557,3±4,227 ^B	545±3,869 ^C	524,2±3,869 ^C

¹ Médias (n=40) nas linhas seguidas por letras em comum não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Os controles apresentaram menor número de mastócitos nos quatro grupos musculares avaliados. No grupo de afetados o infiltrado de mastócitos apresentou aumento significativo ($p<0,05$) comparado ao grupo controle (Tabela 3 e Figura 1B).

Tabela 3

Valores médios¹ (respectivos desvio padrão) e análise de variância para o número de mastócitos no masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães controle de 2, 3, 5 e 8 meses de idade.

Músculos	2 meses	3 meses	5 meses	8 meses
Masseter	119,7±4,926 ^A	95,00±2,898 ^B	93,50±2,739 ^B	55,33±21,28 ^C
Diafragma	74,00±3,742 ^A	65,00±2,530 ^B	63,83±3,312 ^{BC}	50,00±25,72 ^C
Tríceps braquial	274,3±6,563 ^A	135,0±2,366 ^B	124,5±2,588 ^B	88,83±4,792 ^C
Bíceps femoral	277,8±8,085 ^A	134,8±2,483 ^B	144,2±3,061 ^B	84,00±11,83 ^C

¹ Médias (n=40) nas linhas seguidas por letras em comum não diferem entre si pelo teste Tukey ($p<0,05$).

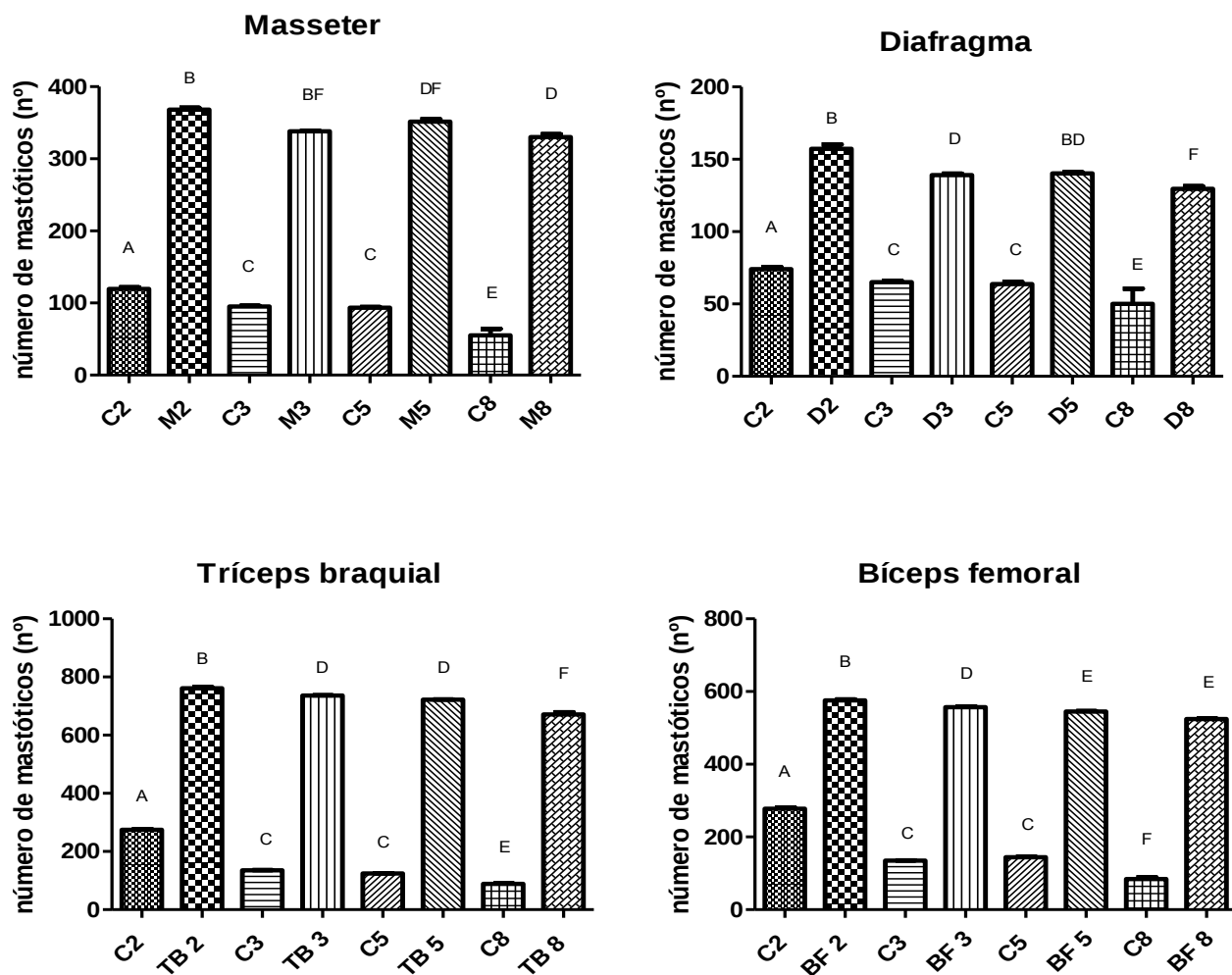


Figura 5. Morfometria dos mastócitos nos músculos masseter (M), diafragma (D), tríceps braquial (TB) e músculo bíceps femoral (BF) do grupo controle (C) e de cães GRMD com idade entre 2, 3, 5 e 8 meses respectivamente. Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.2.2 Morfometria do tecido fibro-colagenoso

Verificou-se intensa deposição de tecido fibro-colagenoso em todos os fragmentos musculares dos animais GRMD. O músculo tríceps braquial apresentou maior quantidade deste tecido, seguido pelos músculos bíceps femoral, diafragma e masseter. A quantidade deste tecido variou em relação ao grupo muscular e faixa etária em todos os grupos musculares estudados (Tabela 4 e Figura 4).

Tabela 4

Valores médios¹ (respectivos desvio padrão) e análise de variância para a deposição de tecido colagenoso no masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães GRMD de 2, 3, 5 e 8 meses de idade.

Músculos	2 meses	3 meses	5 meses	8 meses
Masseter	7,053±1,352 ^A	4,595±0,4926 ^B	3,817±1,350 ^B	1,944±0,442 ^C
Diafragma	17,12±1,687 ^A	12,09±1,369 ^B	5,314±0,506 ^C	3,523±0,283 ^D
Tríceps braquial	53,70±3,715 ^A	45,87±2,369 ^B	6,468±0,427 ^C	8,471±0,697 ^C
Bíceps femoral	31,95±4,704 ^A	25,73±3,484 ^B	15,18±3,267 ^C	6,343±1,498 ^D

¹ Médias (n=40) nas linhas seguidas por letras em comum não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

Quando comparado ao grupo controle, o grupo dos afetados apresentou aumento significativo na quantidade de tecido colagenoso em todos os grupos musculares (p<0,05) medido em porcentagem de tecido por campo (Tabela 5 e Figura 1C).

Tabela 5

Valores médios¹ (respectivos desvio padrão) e análise de variância para a deposição de tecido colagenoso no masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães controle de 2, 3, 5 e 8 meses de idade.

Músculos	2 meses	3 meses	5 meses	8 meses
Masseter	1,167±0,194 ^A	0,706±0,047 ^A	0,690±0,03 ^A	0,407±0,295 ^A
Diafragma	2,518±0,599 ^A	1,080±0,097 ^B	0,818±0,104 ^B	0,256±0,131 ^B
Tríceps braquial	1,213±0,108 ^A	0,701±0,068 ^A	0,650±0,037 ^A	0,382±0,120 ^A
Bíceps femoral	1,038±0,092 ^A	0,711±0,328 ^A	0,603±0,688 ^A	0,238±0,077 ^A

¹ Médias (n=40) nas linhas seguidas por letras em comum não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

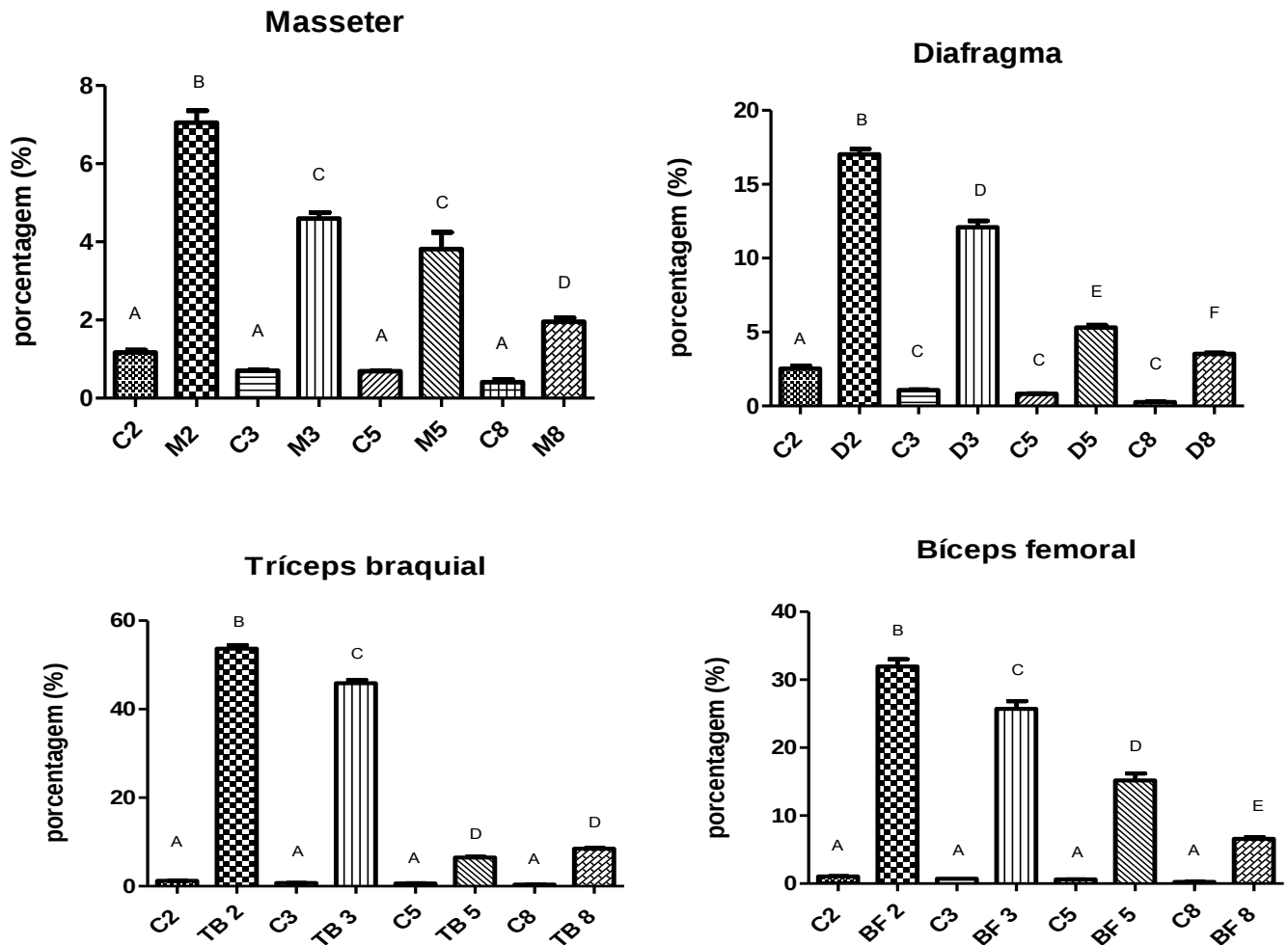


Figura 6. Morfometria de tecido colagenoso nos músculos masseter (M), diafragma (D), tríceps braquial (TB) e músculo bíceps femoral (BF) do grupo controle (C) e cães GRMD com idade entre 2, 3, 5 e 8 meses respectivamente. Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

No masseter, diafragma, tríceps braquial e bíceps femoral de cães distróficos de 2 a 8 meses de idade, foram identificadas lesões caracterizadas por variações no diâmetro das fibras, necrose, hialinização, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, infiltração gordurosa e fibrose intersticial. Essas variavam em extensão e distribuição de acordo com o músculo e a idade, corroborando com o descrito por outros autores para os mesmos músculos e idades entre 10 a 21 meses e 5 a 51 meses, respectivamente (BERETTA et al., 2014; MIYAZATO et al., 2011a; MIYAZATO et al., 2011b).

Da análise dos resultados constatou-se que o músculo masseter apresentou menor incidência de lesões, dentre os quatro músculos avaliados. Acredita-se, que o masseter sofra degeneração mínima nas suas fibras por possuírem menor diâmetro e também pela exposição a uma carga mecânica mais leve do que os músculos localizados nos membros torácicos e pélvicos (LEE et al., 2006).

Na coloração azul de toluidina verificou-se aumento de mastócitos nos grupos distróficos em relação aos controles. Estudo em pacientes DMD com idade média de 41 meses demonstrou aumento no número de mastócitos em amostras musculares, pela técnica de imuno-histoquímica em relação ao grupo controle. Estes mastócitos foram imuno-positivos para o fator de crescimento neural (NGF), enquanto que outras células inflamatórias, tais como linfócitos e macrófagos foram negativos. O NGF é capaz de desencadear e favorecer processos de regeneração na fibra muscular (crescimento e diferenciação dos mioblastos) e tem papel importante na regulação da resposta inflamatória local. Além disso, o NGF induz por meio de ação nos receptores o recrutamento e degranulação dos mastócitos, sendo responsáveis também pela deposição de tecido conectivo nos músculos distróficos (TOTI et al., 2003). Estas premissas explicam a relação entre os níveis de NGF e o número de mastócitos.

A análise quantitativa dos mastócitos mostrou que os músculos tríceps braquial, bíceps femoral, e masseter apresentaram o maior número médio de mastócitos na faixa etária de 2 meses de idade. Acredita-se que esses músculos sejam os mais severamente afetados pelo processo inflamatório nos

animais jovens (em torno de 2 meses) devido ao fato de no período pós natal esses músculos serem os mais ativos, responsáveis pela sucção e locomoção como descrito por Miyazato (2010), Nguyen et al. (2002) e Valentine e Cooper (1991). Pelo exposto, conclui-se que existe uma relação direta entre a degeneração muscular e o número de mastócitos.

No presente estudo o diafragma apresentou diminuição no número médio de mastócitos e na porcentagem de deposição de tecido colagenoso, o que indicaria menor grau de lesão neste músculo. Estudo com onze músculos de cães GRMD de diferentes idades revelou que o diafragma foi o músculo menos acometido e apresentou maior capacidade regenerativa assim como o músculo masseter (MIYAZATO, 2010). Por outro lado, em humanos o diafragma é o principal músculo afetado na idade adulta, período que os pacientes apresentam deformidades estruturais resultante do confinamento em cadeira de rodas (LESSA et al., 2014b). Portanto, o grau de lesão do diafragma em humanos poderia estar relacionado com a idade numa relação direta. Em cães GRMD elas ocorrem em jovens e em humanos nos adultos DMD.

Outro estudo, revelou que cães GRMD com 3 meses de idade apresentavam maior número de mastócitos no músculo fibular longo em relação aos cães GRMD de 6 meses de idade. Numa analogia, os cães GRMD com 6 meses corresponderiam a faixa etária de 11 anos nos pacientes com DMD período em que é necessário o uso de cadeira de rodas pelos acometidos (GOROSPE et al., 1994). O grau de lesão poderia estar relacionado com a atividade muscular, uma vez que pacientes em cadeira de rodas diminuem a movimentação dos membros, assim como a resposta inflamatória.

A inter-relação dos mastócitos com a patogênese da fibrose em cães GRMD é pouco conhecida. No nosso estudo a fibrose foi a mais evidente em cães com 2 meses quando comparados aos de 8 meses de idade. Estudo com cães GRMD com 2, 15, 30, 60 dias e idade e adultos, observou aumento significativo da deposição de tecido fibroso nos músculos quadríceps e tibial anterior, porém não houve aumento da deposição com a idade. O processo distrófico, incluindo a substituição do músculo por tecido fibroso, foi claramente evidente a partir dos 15 dias de idade, bem antes da conclusão da maturação muscular, diferentemente do observado em pacientes DMD, onde a deposição de fibrose está correlacionada com a idade (COZZI et al., 2001).

Segundo Cozzi et al. (2001), a diminuição da fibrose com o avanço da idade pode ser devido ao esgotamento dos potenciais musculares, seguidos de repetidos ciclos de degeneração e regeneração. A extensão da proliferação do tecido conectivo também é variável em pacientes DMD apesar da fibrose geralmente aumentar com a progressão da doença, o que pode sugerir que o processo fibrótico difere entre pacientes e caninos distróficos.

Miofibras deficientes de distrofina possuem instabilidade em sua membrana e a liberação de conteúdo citoplasmático para o meio extracelular poderia agir como estímulo para o recrutamento de mastócitos no endomísio (GOROSPE et al., 1994). Além disso, os mastócitos contêm vários mediadores químicos que atuam na fibrose como a histamina, a triptase e as citocinas que poderiam modular o comportamento dos fibroblastos ou ativar o bFGF (BARRY; GRUBER, 2003; DOUAIHER et al., 2014). No entanto, o bFGF está ligado à matriz extracelular na forma inativa sendo ativado e liberado pelos mediadores dos mastócitos. Acredita-se que a concentração ativa do bFGF na corrente sanguínea seja mais significativa do que a concentração ligada à matriz extracelular (GOROSPE et al., 1994).

Nossos achados confirmam a hipótese que os mastócitos estão em maior número no músculo deficiente de distrofina, participam no comprometimento das lesões histopatológicas e na deposição de tecido colagenoso nas fibras musculares. Os músculos bíceps femoral, tríceps braquial e masseter apresentaram maior número médio de mastócitos e menor intensidade das lesões. Pode-se assim inferir uma relação direta entre a intensidade da lesão e o número de mastócitos. O mesmo foi observado para deposição de tecido colagenoso. A idade de 2 meses apresentou o maior número médio de mastócitos e de fibrose nos grupos musculares e a idade de 8 meses a menor resposta das variáveis estudadas.

Fica assim evidente que o número de mastócitos em cães GRMD estaria relacionado com a intensidade das lesões e não com a idade.

7 CONCLUSÕES

Embora a inter-relação entre os mastócitos e a patogênese da fibrose não estejam completamente elucidados, nossos resultados demonstraram relação direta entre as lesões histopatológicas e o número de mastócitos e de tecido colagenoso nos quatro grupos de musculatura esquelética de cães GRMD de dois a oito meses.

8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. *Imunologia Celular e Molecular*. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (Org.). **Hipersensibilidade Imediata**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 442-461.
- ABDEL-SALAM, E.; ABDEL-MEGUID, I.; KORRAAL, S. S. Markers of degeneration and regeneratio in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v. 28 XXVIII, p. 94-100, 2009.
- ALLIKIAN, M. J.; MCNALLY, E. M. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. **Traffic**, v. 8, p. 177-183, 2007.
- ARAÚJO, K. P. C; HAGIWARA, M. K.; LARSSON, M. H. M. A.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Aspectos clínicos das distrofias musculares em cães. **Ciência Animal**, v. 19, p. 89-102, 2009.
- BALTZER, W. I.; CALISE, D. V.; LEVINE, J. M.; SHELTON, G. D.; EDWARDS, J. F.; STEINER, J. M. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Weimaraner. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 43, p. 227-232, 2007.
- BANKS G. B.; CHAMBERLAIN J. S. The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 84, p. 431-453, 2008.
- BARRY, L.; GRUBER, M. M.; Mast cells in the Pathogenesis of Fibrosis. **Current Rheumatology Reports**, v. 5, p. 147-153, 2003.
- BARTHÉLÉMY, I.; URIARTE, A.; DROUGARD, C.; UNTERFINGER, Y.; THIBAUD, J. L.; BLOT, S. Effects of an immunosuppressive treatment in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy. **PLoS One**, v. 7, p. 1-12, 2012.
- BERETTA, D. C.; MORAES, J. R. E.; ENGRACIA FILHO, J. R.; MALVESTIO, L. M. M.; MORAES F. R. Immunohistochemical and Morphometric Evaluation of Gastrocnemius Muscle and Myotendinous Junction of Golden Retriever Dogs with Muscular Dystrophy. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, p. 70-81. 2014.
- BULFIELD, G.; SILLER, W.; WIGHT, P.; MOORE, K. X-chromosome linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 1189-1192, 1984.
- COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165–172, 2003.

COOPER, B. J.; WINAND, N. J.; STEDMAN, H. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, v. 334, p. 154–156, 1988.

COZZI, F.; CERLETTI, M.; LUVONI, G. C.; LOMBARDO, R.; BRAMBILLA, P. G.; FAVERZANI, S.; BLASEVICH, F.; CORNELIO, F.; POZZA, O.; MORA, M. Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. **Acta Neuropathologica**, v. 101, p. 469–478, 2001.

DANIALOU, G.; COMTOIS, A. S.; DUDLEY, R.; KARPATI, G.; VINCENT, G.; DESROSIERS, C.; PETROF, B. J. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. **The FASEB Journal**, v. 15, p. 1655–1657, 2001.

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

DOUAIHER, J.; SUCCAR, J.; LANCEROTTO, L.; GURISH, M. F.; ORGILL, D. P.; HAMILTON, J. M.; KRILIS, A. S.; STEVENS, R. L. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. **Advances in Immunology**, v. 122, p. 212–237, 2014.

DUMONT, N.; LEPAGE, K.; CÔTÉ, C. H.; FRENETTE, J. Mast cells can modulate leukocyte accumulation and skeletal muscle function following hindlimb unloading. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, p. 97–104, 2007.

EAGLE, M.; BAUDOUIN, S. V.; CHANDLER, C.; GIDDINGS, D. R.; BULLOCK, R.; BUSHBY, K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: Improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. 926–929, 2002.

FRENZEL, L.; HERMINE, O. Mast cells and inflammation. **Joint Bone Spine**, v. 80, p. 141–145, 2013.

GOROSPE, J. R. M.; THARP, M. D.; HINCKLEY, J.; KORNEGAY, J. N.; HOFFMAN, E. P. The role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 122, p. 44–56, 1994.

GRANCHELLI, J. A.; POLLINA, C.; HUDECKI, M. S. Duchenne-like myopathy in double-mutant *mdx* mice expressing exaggerated mast cell activity. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 131, p. 1–7, 1995.

GROUND, M. D.; TORRISI, J. Anti-TNF (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **The FASEB Journal**, v. 8, p. 676–682, 2004.

GULATI, S.; SAXENA, A.; KUMAR, V.; KALRA, V. Duchenne Muscular Dystrophy: Prevalence and patterns of cardiac involvement. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 72, p. 389-393, 2005.

HELLIWELL, T. R.; MAN, N. T.; MORRIS, G. E.; DAVIES, K. E. The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. **Neuromuscular Disorders**, v. 2, p. 177-184, 1992.

HODGETTS, S.; HANNAH, R.; DAVIES, M.; GROUNDS, M. D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 16, p. 591-602, 2006.

HOFFMAN, E. P.; BROWN JUNIOR, R. H.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v. 51, p. 919-928, 1987.

HOFFMAN, E. P.; GOROSPE, J. R. M. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency. **Current Topics in Membranes**, v. 38, p. 113-154, 1991.

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

HOWELL, J. M.; LOCHMÜLLER, H.; O'HARA, A.; FLETCHER, S.; KAKULAS, B. A.; MASSIE, B.; NALBANTOGLU, J.; KARPATI, G. High-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscle of dystrophic dogs: prolongation of expression with immunosuppression. **Human Gene Therapy**, v. 9, p. 629-634, 1998.

KERKIS, I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A.; MARTINS, D. S.; ZUCCONI, E.; FONSECA, S. A. S.; CABRAL, R. M.; MARANDUBA, C. M. C.; GAIAD, T. P.; MORINI, A.; VIEIRA, N. M.; BROLIO, M. P.; SANT'ANNA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?. **Journal of Translation Medicine**, v. 6, p. 1-13, 2008.

KIM, S.; CAMPBELL, K. A.; FOX, D. J.; MATTHEWS, D. J.; VALDEZ, R. Corticosteroid Treatments in Males With Duchenne Muscular Dystrophy: Treatment Duration and Time to Loss of Ambulation. **Journal of Child Neurology**, v. 30, p. 1275-1280, 2015.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, J. R.; BOGAN, D. J.; CHILDERS, M. K.; LI, J.; NGHIEM, P.; DETWILER, D. A.; LARSEN, C. A.; GRANGE, R. W.; BHAVARAJU-SANKA, R. K.; TOU, S.; KEENE, B. P.; HOWARD JR, J. F.; WANG, J.; FAN, Z.; SCHATZBERG, S. J.; STYNER, M. A.; FLANIGAN, K. M.;

XIAO, X.; HOFFMAN E. P. Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. **Mammalian Genome**, v. 23, p. 85–10, 2012.

KORNEGAY, J. N.; LI, J.; BOGAN, J. R.; BOGAN, D. J.; CHEN, C.; ZHENG, H.; WANG, B.; QIAO, C.; HOWARD, J. F. JR.; XIAO, X. Widespread muscle expression of an AAV9 human mini-dystrophin vector after intravenous injection in neonatal dystrophin-deficient dogs. **Molecular Therapy**, v. 18, p. 1501-1508, 2010.

KORNEGAY, J. N.; TULER, S. M.; MILLER, D. M.; LEVESQUE, D. C. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. **Muscle & Nerve**, v. 11, p. 1056-1064, 1988.

KLEOPA, K. A.; DROUSIOTOU, A; MAVRIKIOU, E; ORMISTON, A; KYRIAKIDES. T. Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 15, p. 1623-1628, 2006.

LANFOSSI, M; COZZI, F; BUGINI, D; COLOMBO, S; SCARPA, P; MORANDI, L; GALBIATI, S; CORNELIO, F; POZZA, O; MORA, M. Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. I. Delayed postnatal maturation of affected and normal muscle as revealed by myosin isoform analysis and utrophin expression. **Acta Neuropathologica**, v. 97, p. 127-138, 1999.

LAPIDOS, K. A.; KAKKAR, R.; MCNALLY, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. **Circulation Research**, v. 94, p. 1023-1031, 2004.

LEE, W-H.; ABE, S.; KIM, H-J.; USAMI, A.; HONDA, A.; SAKIYAMA, K.; IDE, Y. Characteristics of muscle fibers reconstituted in the regeneration process of masseter muscle in an mdx mouse model of muscular dystrophy. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 27, p. 235–240, 2006.

LESSA, T. B.; ABREU, D. K.; RODRIGUES, M. N.; BRÓLIO, M. P.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Morphological and ultrastructural evaluation of the Golden Retriever muscular dystrophy trachea, lungs, and diaphragm muscle. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, p. 857-861, 2014a.

LESSA, T. B.; CARVALHO, R. C.; SPAGNOLO, J. D.; SILVA, L. C.; CORTOPASSI, S. R.; AMBRÓSIO, C. E. Laparoscopic guided local injection in the X-linked muscular dystrophy mouse (mdx) diaphragm. An advance in experimental therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, p. 715-720, 2014b.

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

LUNA, L. G. **Manual of histologicstaining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 3 ed. New York: McGraw/Hill, 1968, p.258.

MALVESTIO, L. M. M.; MARTINS, I. M.; MOARES, F. R.; MORAES, J. R. E. Histopathologic Evolution of Cardiomyopathy in a Canine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 5, p. 121-126, 2015.

MARQUES, M. J.; MACHADO, R. V.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. **Muscle Nerve**, v. 37, p. 31-37, 2008.

MATSUMURA, K; ERVASTI, J. M.; OHLENDIECK, K.; KAHL, S. D.; CAMPBELL, K. P. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. **Nature**, v. 360, p. 588-591, 1992.

MERLINI, L.; SABATELLI, P. Improving clinical trial design for Duchenne muscular dystrophy. **BCM Neurology**, v. 15, p. 2-6, 2015.

MIYAZATTO, L. G. **Histopatologia e imunohistoquímica na distrofia muscular no Golden Retriever**. 2010. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

MIYAZATO, L. G.; BERETTA, D. C.; ENGRACIA FILHO, J. R.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Evaluation of Intracellular Calcium in Golden Retriever Muscular Dystrophy. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 4, p. 95-102, 2011a.

MIYAZATO, L. G.; BERETTA, D. C.; ENGRACIA FILHO, J. R.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Involvement of organic systems in golden retriever X-linked muscular dystrophy. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, p. 87-94, 2011b.

MORAES, J. R. E.; MALVESTIO, L. M. M.; MARTINS, I. M.; MORAES, F. R. The value of dog for knowledge of human Duchenne muscular dystrophy: New findings in pathogenesis and therapeutic advances. In: HONÓRIO, S.A.A. (Org.). **Duchenne muscular dystrophy: Symptoms, management and prognosis**. New York: Ed Nova Biomedical, 2015. p. 141-153.

MORINI, A. C.; MIGLINO, M. A.; CARVALHO, M. B.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; OLIVEIRA, L. J.; CATELLI, A. A.; SOUZA, A. P.; KFOURY JUNIOR, J. R.; LUPPI, M. M. C. P.; GAIAD, T. P.; ZATZ, M. Análise das dosagens e concentrações séricas da ciclosporina A em cães da raça Golden

Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 131-137, 2008.

NAHIRNEY, P. C.; DOW, P. R.; OVALLE, W. K. Quantitative morphology of mast cells in skeletal muscle of normal and genetically dystrophic mice. **The Anatomical Record**, v. 247, p. 341-349, 1997.

NAKAMURA, A.; TAKEDA, S. Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. **Journal Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

NIGRO, G.; COMI, L. I.; POLITANO, L.; BAIN, R. J. I. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. **International Journal of Cardiology**, v. 26, p. 271-277, 1990.

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

PRADO, C. M.; CELES, M. R. N.; MALVESTIO, L. M.; CAMPOS, E. C.; SILVA, J. S.; JELICKS, L. A.; TANOWITZ, H. B.; ROSSI, M. A. Early dystrophin disruption in the pathogenesis of experimental chronic chagas cardiomyopathy. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 59-68, 2012.

REBER, L. L.; FROSSARD, N. Targeting mast cells in inflammatory diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, p. 416-435, 2014.

RYBAKOVA, I. N.; PATEL, J. R.; ERVASTI, J. M. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, p. 1209-1214, 2000.

RUOSS, S. J.; HARTMANN, T.; CAUGHEY, G. H. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 493-499, 1991.

SAMPAOLESI, M.; BLOT, S.; D'ANTONA, G.; GRANGER, N.; TONLORENZI, R.; INNOCENZI, A.; MOGNOL, P.; THIBAUD, J. L.; GALVEZ, B. G.; BARTHÉLÉMY, I.; PERANI, L.; MANTERO, S.; GUTTINGER, M.; PANSARASA, O.; RINALDI, C.; CUSELLA, M. G. A.; TORRENTE, Y.; BORDIGNON, C.; BOTTINELLI, R.; COSSU, G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. **Nature**, v. 444, p. 574-579, 2006.

SCHATZBERG, S.J.; OLBY, N.J.; BREEN, M.; ANDERSON, L.V.; LANGFORD, C.F.; DICKENS, H.F.; WILTON, S.D.; ZEISS, C.J.; BINNS, M.M.; KORNEGAY, J.N.; MORRIS, G.E.; SHARP, N.J. Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog. **Neuromuscular Disorders**, v. 9, p. 289-295, 1999.

SHIMATSU, Y.; KATAGIRI, K.; FURUTA, T.; NAKURA, M.; TANIOKA, Y.; YUASA, K.; TOMOHIRO, M.; KORNEGAY, J. N.; NONAKA, I.; TAKEDA, S. Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). **Experimental Animals**, v. 52, p. 93-97, 2003.

TOTI, P.; VILLANOVA, M.; VATTI, R.; SCHUERFELD, K.; STUMPO, M.; BARBAGLI, L.; MALANDRINI, A.; COSTANTINI, M. Nerve growth factor expression. In human dystrophic muscles. **Muscle & Nerve**, v. 27, p. 370-373, 2003.

TOWBIN, J. A. The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p.131-139, 1998.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscle reduces muscle membrane damage without increasing the expression of membrane-associated cytoskeletal proteins. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 82, p. 312-320, 2004.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; CUMMINGS, J. F.; DE LAHUNTA, A. Canine X linked muscular dystrophy: morphologic lesions. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 97, p. 1-23, 1990.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DE LAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal of Neurological Sciences**, v. 88, p. 69-81, 1988.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J. Canine X-linked muscular dystrophy: selective involvement of muscles in neonatal dogs. **Neuromuscular Disorders**, v. 1, p. 31-38, 1991.

VALENTINE, B. A.; CUMMINGS, J. F.; COOPER, B. J. Development of Duchenne-type cardiomyopathy. Morphologic studies in a canine model. **The American Journal of Pathology**, v. 135, p. 671-678, 1989.

VAN BOCKEL, E. A. P.; LIND, J. S.; ZIJLSTRA, J. G.; WIJKSTRA, J. A.; MEIJER, P. M.; VAN DEN BERG, M. P.; SLART, R. H. J. A.; AARTS, L. P. H. J.; TULLEKEN, J. E. Cardiac assessment of patients with late stage Duchenne muscular dystrophy. **Netherlands Heart Journal**, v. 17, p. 232-237, 2009.

WOOLF, P. J.; LU, S.; CORNFORD-NAIRN, R.; WATSON, M.; XIAO, X. H.; HOLROYD, S. M.; BROWN, L.; HOEY, A. J. Alterations in dihydropyridine receptors in dystrophin-deficient cardiac muscle. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 290, p. 2439-2445, 2006.