

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA NA DISTROFIA MUSCULAR DO
GOLDEN RETRIEVER**

Ligia Gomes Miyazato
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA NA DISTROFIA MUSCULAR DO
GOLDEN RETRIEVER**

Ligia Gomes Miyazato

Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LIGIA GOMES MIYAZATO - nascida em 26 de dezembro de 1978, em Santa Bárbara do Oeste, São Paulo, filha de Sérgio Moricazu Miyazato e Eunice Gomes Miyazato. Em 1998, ingressou na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Campus de Jaboticabal, no curso de Medicina Veterinária. No período de agosto de 2001 a julho de 2002 foi bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo sob orientação da Prof^a. Dr^a. Julieta Rodini Engrácia de Moraes. Graduou-se Médica Veterinária em dezembro de 2002. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Campus de Jaboticabal em agosto de 2003 e obteve o título de Mestre em dezembro de 2005, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Julieta Rodini Engrácia de Moraes. Entre agosto de 2005 e julho de 2006 atuou como pesquisadora no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – CPPAR, em Jaboticabal/SP. Iniciou o Doutorado em março de 2006 pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Campus de Jaboticabal, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Julieta Rodini Engrácia de Moraes. Estagiou no período de 01 março a 31 de julho de 2009 no departamento de Patologia e Laboratório de Medicina da Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Norte – UNC, em Chapel Hill/Carolina do Norte, sob a orientação do Prof. Dr. Joe N. Kornegay.

"A natureza criou o tapete sem fim que recobre a superfície da terra.
Dentro da pelagem desse tapete vivem todos os animais, respeitosamente.
Nenhum o estraga, nenhum o rói, exceto o homem."

(Monteiro Lobato)

DEDICO

Aos meus pais, Sérgio e Eunice, que sempre me apoiaram e caminharam ao meu lado.

Ao meu noivo, José Alexandre, pela paciência, dedicação e apoio aos meus estudos.

Aos meus irmãos, Daniela, Tatiana, Denise e Sérgio, e ao meu sobrinho Felipe que sempre compartilharam juntos as dificuldades do dia a dia.

Aos meus bichos de estimação: Toy, Jade, Darcy, Nina, Cherloque (*in memorian*), Rold (*in memorian*), Mingau (*in memorian*), Loly (*in memorian*), Tula (*in memorian*), Tochinha (*in memorian*), Samanta (*in memorian*), Bulle (*in memorian*), Vítor e Loue. Vocês são os responsáveis pelo o quê sou hoje.

Aos animais que participaram deste experimento, pois sem vocês não conseguiria completar mais uma etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora Julieta que me confiou o pioneirismo dessa pesquisa e acreditou em mim.

Ao meu noivo José Alexandre pelo processamento e interpretação das análises estatísticas. Obrigada pela paciência.

Às minhas grandes amigas Fabiana Bozzo, Renata Gêmio, Bianca Martins, Gláucia Bueno, Paula Albuquerque, Beatriz Junqueira, Karina Gonçalves e Neida Bortoluzzi que me acompanharam e que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui.

Ao meu grande amigo e companheiro de laboratório Daniel Berêta que foi meu braço direito durante o doutorado.

Aos meus amigos de Jaboticabal que direta ou indiretamente contribuíram na minha pesquisa: Daniel Gerardi, Sabrina Santos Costa, Patrícia Jordão, Maria Raquel Almeida, Ana Letícia, Andréa Gomes, Marcy Lancia, Roberta Zuin, Carolina Paula, Geórgia Modé, Ana Carolina Trompiere, Marcelo Castro, Moema Makiko, Lívia Bergamin, Tatiana Rodrigues, Maria Ângela Coelho e Ana Paula Jacintho.

Agradeço ao professor Dr. Luciano Serafini Néder por abrir as portas de seu laboratório.

Aos meus amigos do departamento de patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que me introduziram na imunistoquímica: Maria Paula, Patrícia Monteiro, Elder Latorraca e Deise.

Às funcionárias do Departamento de Patologia Veterinária, Francisca da Assis Ardisson, Maria Inês Yamazaki de Campos, Edgard Homem, Narcizo Batista Tel e Ronaldo Delvecchio pela ajuda na colheita e processamento do material utilizado neste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio à pesquisa e bolsa de doutorado, imprescindíveis para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – DISTROFIA MUSCULAR NO GOLDEN RETRIEVER COMO MODELO PARA O ESTUDO COMPARADO – REVISÃO	01
Lesões na DMGR	03
Participação das células imunes na patogenia das distrofinopatias	04
A regeneração no músculo distrófico	10
Fator de crescimento vascular endotelial na distrofia muscular	13
Terapias na Distrofia Muscular de Duchenne.....	14
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2 – HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA NA DISTROFIA MUSCULAR DO GOLDEN RETRIEVER	41
RESUMO	41
ABSTRACT	43
1. Introdução	45
2. Material e Métodos	49
2.1. Animais	49
2.2. Colheita e processamento das amostras	49
2.3. Análise histológica das lesões	50
2.4. Análise imunoistoquímica	51
2.4.1. Avaliação imunoistoquímica	52
2.5. Análise Estatística	53
3. RESULTADOS	54
3.1. Análise histológica das lesões	54
3.2. Estudo imunoistoquímico	57
3.2.1. Imunomarcção de linfócitos T-CD3, T-CD4 e T-CD8	57
3.2.2. Imunomarcção do antígeno MHC I	62
3.2.3. Imunomarcção do antígeno MHC II	65
3.2.4. Expressão da Vimentina	68

3.2.5. Expressão do VEGF	71
4. DISCUSSÃO	74
5. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE	89

LISTAS DE ABREVIATURAS

ABC - complexo estreptoavidina-biotina peroxidase

CDDM - células dendríticas derivadas de monócitos

CDG - complexo distrofina-glicoproteínas

CEs - células endoteliais

CS - células satélites

CT - células tronco

DM – Distrofia Muscular

DMD – Distrofia Muscular de Duchenne

DMGR – Distrofia Muscular no Golden Retriever

EP – erro padrão

GR – Golden Retriever

HE – Hematoxilina-eosina

IFN- γ - interferon- γ

IL-1 - interleucina 1

IL-2 - interleucina 2

IL-3 - interleucina 3

IL-4 - interleucina 4

IL-5 - interleucina 5

IL-6 - interleucina 6

IL-10 - interleucina 10

IL-12 - interleucina 12

IL-13 - interleucina 13

IL-18 - interleucina 18

kDa - quilodalton

LTCs - linfócitos T citotóxicos

MHC - complexo maior de histocompatibilidade

MHC I – complexo maior de histocompatibilidade de classe I

MHC II – complexo maior de histocompatibilidade de classe II

MI – miopatias inflamatórias

µm - micrômetros

PBS- tampão salina fosfato

TBST - tampão tris salina Tween 20

T-CD4+ - linfócito T auxiliar

T-CD8+ - linfócito T citotóxico

TGM – Tricrômio de Gomori modificado

Th0 – células T auxiliares 0

Th1 - células T auxiliares 1

Th2 - células T auxiliares 2

TNF α - fator de necrose tumoral α

VEGF - Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VEGF-A - Fator de Crescimento Vascular Endotelial A

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01. Graus de lesão para músculos distróficos corados com HE e TGM.....	50
Tabela 02. Especificações dos anticorpos empregados nas reações de imunoistoquímica. Método ABC. Jaboticabal, SP, 2010.....	51
Tabela 03. Padrão de distribuição das imunomarcações nos músculos distróficos para detecção dos anticorpos anti-vimentina, anti-VEGF e anti-MHC II.....	53
Tabela 04. Mediana e desvio padrão dos graus de lesões encontrados nos grupos distróficos de diferentes idades. Jaboticabal, SP, 2010.....	57
Tabela 05. Frequência (%) dos graus de lesões encontrados nos grupos distróficos de diferentes idades. Jaboticabal, SP, 2010.....	57
Tabela 06. Média e erro padrão do número de linfócitos T-CD3 por 0,0052 mm ² nos músculos dos grupos controle e distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.....	58
Tabela 07. Média e erro padrão do número de linfócitos T-CD4 por 0,0052 mm ² nos músculos dos grupos controle e distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.....	59
Tabela 08. Média e erro padrão do número de linfócitos T-CD8 por 0,0052 mm ² nos músculos dos grupos controle e distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.....	59
Tabela 09. Grau de intensidade da imunoexpressão do antígeno MHC I, erro padrão (EP), valores mínimo e máximo nos músculos dos grupos distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.....	62

Tabela 10. Escores médios, erro padrão (EP), mínimos e máximos da imunoexpressão do MHC II dos músculos dos grupos distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.....	65
Tabela 11. Escores médios, erro padrão (EP), mínimos e máximos da imunoexpressão da vimentina nos músculos dos grupos distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.....	68
Tabela 12. Escores médios, erro padrão (EP), mínimos e máximos da imunoexpressão do VEGF nos músculos dos grupos distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.....	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Lesões musculares em cães DMGR. A. Músculo masseter. Miofibras com variações no diâmetro, aparência escura (seta), necrose de miofibras e células inflamatórias distribuídas pelo interstício (*). HE. B. Músculo bíceps braquial. Calcificação distrófica (seta) e infiltração de gordura interfascicular (<). HE. C. Músculo semitendinoso. Fibras "ragged-red fibres" (seta) e fibrose perimisial e endomisial acentuada (*). TGM. Barra = 50 µm.....</p>	56
<p>Figura 2. Reação imunoistoquímica para detecção de linfócitos T em músculos distróficos. A. Músculo masseter expressando T-CD3 (<). B. Músculo diafragma expressando T-CD4 (<). C. Músculo semitendinoso expressando T-CD8 (<). Método ABC. Barra = 50 µm.....</p>	61
<p>Figura 3. Imunomarcações do antígeno MHC I na superfície de miofibras (seta) e áreas de necrose e inflamação (*) nos músculos distróficos de cães golden retriever. A. Diafragma - marcações fracas. B. Masseter - marcações moderadas. C. Semitendinoso - marcações intensas. Método ABC. Barra = 50 µm.....</p>	64
<p>Figura 4. Reação de imunoistoquímica para detecção do antígeno MHC II em músculos distróficos. A. Músculo bíceps femoral (escore 1). B. Músculo tríceps braquial (escore 2). C. Músculo masseter (escore 3). Imunomarcação em grupos de células inflamatórias mononucleares em área de degeneração e necrose (*). Método ABC. Barra = 50µm.....</p>	67

- Figura 5.** Reação de imunistoquímica para detecção da vimentina em cortes histológicos de músculos. A. Músculo masseter. Marcações nas paredes de vasos sanguíneos (seta) e células satélites (cabeça da seta). B. Músculo semitendinoso. Marcações de miofibras em regeneração (seta). C. Músculo sartório cranial. Marcações em áreas de necrose (*) com macrófagos ao redor. Método ABC. Barra = 50 μm 70
- Figura 6.** Imunistoquímica para detecção de VEGF. A. Músculo masseter. Área de fibras em regeneração (*). B, C. Músculo Semimembranoso. Marcações em áreas de necrose e células inflamatórias mononucleares (seta). Método ABC. Barra = 50 μm 71

CAPÍTULO 1 – DISTROFIA MUSCULAR NO GOLDEN RETRIEVER COMO MODELO PARA O ESTUDO COMPARADO - REVISÃO

Dentre as doenças neuromusculares incluem-se as distrofias, miopatias hereditárias caracterizadas por fraqueza, degeneração muscular progressiva e substituição do tecido muscular por tecido conectivo de características fibroadiposas (BAROHN, 2001)¹. Existem pelo menos 30 formas diferentes de manifestações, cuja herança pode ser autossômica dominante, recessiva ou recessiva ligada ao cromossomo X (ZATZ; VAINZOF; PASSO-BUENO, 2000).

As distrofias musculares mais comuns envolvem mutações do complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), constituído pelas proteínas intracelulares distrofina e sintrofina e pelas proteínas sarcolemais distroglicanas (sub-unidades α e β) e sarcoglinas (sub-unidades α , β , γ e δ) (SPENCE; CHEN; WINDER, 2002).

A distrofina é uma proteína citoesquelética importante na manutenção da integridade estrutural do músculo durante o processo de contração (SHELTON et al., 2001). Esta proteína está presente nas musculaturas lisa, cardíaca e esquelética e age como uma âncora entre o citoesqueleto intracelular de actina e o CDG (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987).

A ausência da distrofina na fibra muscular resulta em doença clinicamente severa chamada Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) em humanos. Esta distrofia é ligada ao cromossomo X e acomete meninos (GIROLAMI; ANTHONY; FROSCHE, 2001). No homem, a incidência da DMD é de um para cada 3.500 nascimentos masculinos e a prevalência aproxima-se de um em cada 18.000 homens (BAROHN, 2001; EMERY, 1993).

A distrofia muscular ligada ao sexo, associada com a deficiência de distrofina, também foi relatada em algumas raças de cães e é melhor caracterizada na raça golden retriever (GR), sendo conhecida como Distrofia Muscular do golden retriever

¹ Normas de Documentação ABNT – NBR 10520 – Citações em documentos – Apresentação - 2002

(DMGR), forma mais comum da doença em cães (BERGMAN et al., 2002; SHELTON et al., 2001).

A distrofia muscular no homem e no cão é adquirida por intermédio de fêmeas portadoras assintomáticas ou pela ocorrência de mutações no gene da distrofina (2,4 MB). Assim como no homem, a doença acomete cães machos que manifestam doença neuromuscular associada a cardiomiopatia (SHELTON et al., 2001).

A hipertrofia dos músculos da panturrilha é referida como uma das características mais marcantes da doença em humanos (DUCHENNE, 1868; GOWERS, 1879). Similarmente, cães adultos distróficos GR apresentam hipertrofia dos músculos dos membros torácicos, da língua, do diafragma, do sartório e do esôfago e atrofia dos demais músculos esqueléticos (KORNEGAY et al., 1988, 2003; VALENTINE et al. 1990). Nos cães neonatos, a musculatura flexora apresenta-se acometida severamente em decorrência da sua grande utilização durante esta fase da vida (VALENTINE; COOPER, 1991). Os efeitos da deficiência de distrofina variam entre e dentro das espécies, entretanto, as alterações fenotípicas entre os músculos com ausência de distrofina ainda são pouco compreendidas (AMBRÓSIO et al., 2009; EDWARDS et al., 1984; HOFFMAN; GOROSPE, 1991).

Na DMGR, além da hipertrofia da musculatura, há outros sinais clínicos que incluem fraqueza muscular, disfagia, tremores, intolerância ao exercício, deformidade e deslocamento dos membros e atividade da creatinaquinase sérica elevada (BERGMAN et al., 2002; KORNEGAY et al., 1988; SHELTON et al., 2001; VALENTINE et al., 1986, 1988). Aproximadamente 72,7% dos cães apresentam como *causa mortis* falência cardio-respiratória (FLETCHER et al., 2001; MIYAZATO, 2005; VALENTINE et al., 1988). As taxas de mortalidade são mais elevadas nas duas primeiras semanas de vida e entre 7 e 9 meses de idade (HOWELL et al., 1994; MIYAZATO, 2005; VALENTINE et al., 1988; VALENTINE; COOPER, 1991).

Dentre as alterações necroscópicas de cães com DMGR destacam-se o aumento dos músculos dos membros torácicos, da língua, do diafragma e da musculatura do esôfago. Todos os músculos esqueléticos apresentam cor e consistência normais (KORNEGAY et al., 1988; MIYAZATO, 2005). Insuficiência cardíaca congestiva foi

descrita em animais acima de 4 meses de idade, devido à presença de lesões cardíacas, congestão hepática e grande volume de líquido nas cavidades torácica e abdominal (MIYAZATO, 2005; VALENTINE; CUMMINGS; COOPER, 1989). Lesões presentes no fígado, estômago e alças intestinais, decorrentes de degeneração da camada muscular lisa destes órgãos, induzem gastrites, úlceras e enterites (MIYAZATO, 2005).

Lesões na DMGR

Nas distrofinopatias, as miofibras tornam-se frágeis, de modo que os movimentos de contração e tensão induzem estresse muscular com conseqüente ruptura da membrana plasmática (sarcoplasma), liberação de enzimas musculares, efluxo de fluido para o meio extracelular e aumento da concentração do cálcio intracelular. Estas alterações hidrodinâmicas quebram a homeostasia celular e ativam proteases endógenas, iniciando o processo de degeneração da miofibrila. Simultaneamente, o cálcio se acumula no interior das mitocôndrias ocasionando déficit energético dentro da miofibrila e morte celular na maioria dos casos. Esta seqüência de eventos é responsável pelo desenvolvimento de lesões típicas das distrofias musculares. Por serem oriundas de processo de degeneração contínuo e progressivo, algumas delas são mais freqüentes em determinados estágios da doença (COZZI et al., 2001).

Nos estágios iniciais da DMGR, em cães neonatos, são encontrados pequenos grupos de fibras necróticas, outras regeneradas ou hialinizadas, edema proeminente do tecido conectivo endomisial e infiltrado histiocítico intersticial considerável. As miofibrilas necróticas apresentam citoplasma hiperacidofílico, margens indistintas e perda do detalhe citoplasmático. Por outro lado, as fibras hialinizadas estão em estado de hipercontração e mostram-se grandes, escuras e aleatoriamente dispersas no interstício. A regeneração das miofibrilas ocorre após sua necrose (KENYON; CURTES, 2006; NGUYEN et al., 2002).

A extensão, associação e distribuição das diferentes lesões dependem do músculo e do animal. Em geral, nos neonatos identificam-se um ou dois tipos e em cães de dois meses de idade são múltiplas e associadas (NGUYEN et al., 2002).

Em cães DMGR de diferentes idades foram caracterizados seis tipos de lesões nos músculos esqueléticos, quais sejam: alterações de diâmetro, necrose, hialinização, calcificação, fibrose e infiltração de tecido adiposo. A regeneração de miofibras é mais intensa nos animais jovens, enquanto que o grau da necrose é variável nos cães distróficos de diferentes idades (MIYAZATO, 2005; NGUYEN et al., 2002; VALETINE et al., 1990). Estes fatos sugerem que fatores pró-inflamatórios, como os de crescimento, e os mediadores químicos, sejam liberados em resposta à necrose das miofibras, nos diferentes estágios da doença, induzindo a regeneração muscular (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Participação de células imunes na patogenia das distrofinopatias

A necrose do músculo distrófico é induzida por dano mecânico no seu sarcoplasma (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987; KOENIG et al., 1987; MONACO; KUNKEL, 1988). No entanto, diferenças na evolução da doença entre os diferentes modelos animais indicam que há alterações mais complexas na homeostase muscular do que um simples dano mecânico (BROOKE et al., 1987; DRACHMAN; TOYKA; MYER, 1974). A atividade imunossupressora da prednisona nos pacientes DMD e no camundongo mdx sugere que células imunes desempenhem papel significativo nas lesões do músculo deficiente em distrofina (SPENCER et al., 2001).

Entretanto, há outro questionamento - as células imunes possuem papel específico na patogenia das distrofinopatias ou sua atuação seria apenas uma resposta inespecífica ao tecido danificado mecanicamente? Pesquisas concebidas com base nestas questões foram intensificadas (SPENCER; TIDBALL, 2001).

Na resposta imune adaptativa, os linfócitos T expressando CD4⁺ (células T auxiliares) e CD8⁺ (células T supressoras ou citotóxicas) desempenham papel importante. Quando os linfócitos T-CD4⁺ ligam-se aos antígenos apresentados por

macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, liberam linfocinas que atraem mais leucócitos ao local da lesão. Contrariamente, os linfócitos T-CD8⁺ secretam moléculas que matam as células às quais eles se ligam. Em geral estes últimos monitoram todas as células do corpo e destroem qualquer célula que expresse fragmentos de antígenos como, por exemplo, partículas virais (ACKERMANN, 2007).

Existem duas subpopulações principais de células T auxiliares que são distinguidas pela mistura das citocinas que secretam e que são denominadas células T auxiliares 1 (Th1) e auxiliares 2 (Th2) (TIZARD, 2002). Essas subpopulações respondem ao antígeno e aos coestimuladores apresentados pelas células apresentadoras de antígeno. As células Th1 respondem aos antígenos apresentados pelas células B, utilizando a molécula coestimuladora CD80. Elas secretam interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interferon- γ (IFN- γ) e fatores de necrose tumoral (TNF) α e β em resposta ao estímulo antigênico, interleucina 12 (IL-12) e interleucina 18 (IL-18). Estas células agem primariamente como auxiliares nas respostas imunomediadas, tais como a reação de hipersensibilidade retardada e a ativação de macrófagos. As células Th2 respondem aos antígenos apresentados por células dendríticas derivadas de monócitos (CDDM) e macrófagos. Estas são especificamente ativadas por sinais gerados através da molécula coestimuladora CD86 e secretam interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13) em resposta ao estímulo antigênico e a interleucina 1 (IL-1). Estas células estimulam a proliferação de células B e a secreção de imunoglobulinas (TIZARD, 2002).

Existe também um terceiro fenótipo de célula T auxiliar que secreta uma mistura de citocinas. Essas células são denominadas de células T auxiliares 0 (Th0) e devem ser precursoras de Th1 e Th2 ou células que estão em transição entre as duas populações. Elas secretam IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ . Estas, quando cultivadas na presença de IL-4 tornam-se Th2 e quando cultivadas na presença de IL-12 tornam-se Th1. Populações celulares Th0 são produzidas inicialmente na resposta imune, e os subgrupos de Th1 e Th2 são produzidos nos casos de doenças crônicas nos quais os antígenos são persistentes e não podem ser facilmente removidos (TIZARD, 2002).

Comprovou-se há anos que os linfócitos T, especialmente os T citotóxicos (T-CD8⁺), estão entre os maiores constituintes da população de células inflamatórias no músculo distrófico, principalmente na forma ativa (ARAHATA; ENGEL, 1988; EMSLIE-SMITH; ARAHATA; ENGEL, 1989; ENGEL; ARAHATA, 1986; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990). A participação de linfócitos CD8⁺ foi sustentada pela melhora clínica obtida com o uso de drogas antiinflamatórias esteroidais no tratamento das distrofinopatias. Seu uso em pacientes DMD aumenta a força muscular e função pulmonar e diminui a invasão da musculatura por linfócitos CD8⁺ (BROOKE et al., 1987; DRACHMAN; TOYKA; MYER, 1974; FENICHEL et al., 1991; GRIGGS et al., 1991; KISSEL et al., 1991).

Outro fato importante é o mecanismo de morte celular da miofibras distróficas. Sabe-se que no camundongo distrófico mdx, nos estágios iniciais da doença, a morte celular por apoptose e necrose são induzidas por linfócitos T citotóxicos (LTCs). No entanto, estes dois mecanismos não podem ser identificados de forma distinta, levando a existência de duas hipóteses. A primeira é de que há um fator comum que induz ambos os processos no músculo distrófico mdx e a segunda é de que a apoptose ocorreria antecedendo a necrose tecidual (TIDBALL et al., 1995; ZYCHLINSKY et al., 1991).

Sabe-se que a perforina é uma proteína citotóxica e citolítica sintetizada e liberada pelos LTCs. Ela e um grupo de proteases (gran-enzimas) estão contidos nos lisossomos e participam da lise induzida pelos LTCs (BERKE, 1995; KAGI et al., 1994ab; WALSH et al., 1994). Investigando-se a ação dos LTCs no músculo distrófico de camundongos mdx descobriu-se que, após sua ligação na célula-alvo, são secretadas perforina e gran-enzimas na superfície celular que induzem apoptose. Neste mesmo estudo, observou-se que em animais imunossuprimidos as lesões distróficas são atenuadas com redução das células T CD8⁺ e dos prejuízos causados por sua citotoxicidade. Também foi observada diminuição da morte celular por apoptose e por necrose com redução de mionúcleos apoptóticos e de miofibras invadidas, respectivamente (SPENCER et al., 1997).

Adicionalmente, outras pesquisas relataram que a irradiação de camundongos mdx na fase anterior ao período necrótico proporcionou melhora ou atraso do surgimento dos sintomas clínicos, devido à redução no número de células imunes. Estas observações reafirmam a participação do sistema imune na promoção das lesões no músculo distrófico (GRANATA et al., 1998; PAGEL; PARTRIDGE, 1999; SPENCER et al., 1997).

Acredita-se também na participação efetiva de T-CD4⁺ nas distrofinopatias. Tal suspeita está embasada na alta concentração de linfócitos T-CD4⁺ em relação aos T-CD8⁺ e do tempo em que ocorre a invasão dos mesmos no tecido distrófico (SPENCER et al., 1997). Estudos demonstraram que LTCs são dependentes de IL-2 para serem completamente ativados e que esta citocina é fornecida por células T auxiliares (CD4⁺), quando próximas aos CD8⁺ (GONZÁLEZ-QUINTIAL et al., 1996; UTZ; McFARLAND, 1994). O aumento de células T auxiliares no músculo mdx foi comprovado até oito semanas de idade, ressaltando a participação de CD4⁺ na ativação de LTCs no local da injúria (SPENCER et al., 1997). Em outro estudo, foram comparados os efeitos da depleção de linfócitos T-CD4⁺ e T-CD8⁺ e verificou-se redução significativa em 61% e 75% de lesão muscular, respectivamente dos animais distróficos (SPENCER et al., 2001). Tais resultados reafirmaram a participação de células T nas distrofinopatias e sustentam a hipótese de que terapias com efeitos sobre o sistema imune podem proporcionar benefícios aos pacientes DMD (SPENCER et al., 2001).

Sabe-se que a depleção de células T CD8⁺ leva a redução de outras células inflamatórias como os eosinófilos que são capazes de lesar fibras musculares (CAI et al., 2000). Adicionalmente, camundongos mdx deficientes em células T apresentam redução da fibrose muscular, sugerindo sua participação nesse processo com prejuízos na regeneração (MORRISON et al, 2000).

A resposta autoimune se desenvolve nos casos onde há grande quantidade de tecido danificado como, por exemplo, infarto do miocárdio, cardiomiopatias e miocardites (LATIF et al., 1993; MAISCH, 1989; NEU et al., 1993). Esta autoimunidade se origina de proteínas intracelulares liberadas na corrente sanguínea que estimulam a resposta imune (SPENCER; TIDBALL, 2001). Sabe-se que o músculo distrófico libera

elevadas quantidades de proteínas citosólicas no espaço extracelular durante a contração muscular que são capturadas por células apresentadoras de antígenos e ativam células T. Sendo assim é possível que o dano mecânico produzido no músculo distrófico ao liberar proteínas intracelulares resulte no desenvolvimento de uma resposta autoimune (SPENCER; TIDBALL, 2001).

Outro papel importante da atuação do sistema imune é realizado pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC), que se expressa na superfície das células nucleadas dos mamíferos. O MHC é constituído por proteínas específicas de membrana e é indispensável para complementar a ação dos linfócitos T (HALLORAN; WADGYMAR; AUTENRIED, 1986; HARRIS; GILL, 1986; MARTZ; HEAGY; GROMSOWSKI, 1983; McMICHAEL, 1980; PLOEGH; ORR; STROMINGER, 1981).

Os produtos do gene do MHC são subdivididos em classe I (MHC I) e classe II (MHC II) e podem ser identificados com o uso de anticorpos monoclonais específicos em culturas e suspensões celulares, cortes de tecidos e imunoblots teciduais homogeneizados (PONDER et al., 1983). No tecido muscular sua expressão normalmente se dá na superfície de vasos sanguíneos e capilares (APPLEYARD et al., 1985; EMSLIE-SMITH; ARAHATA; ENGEL, 1989; KARPATI; POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989).

Para que ocorra a ação citotóxica de linfócitos T CD8⁺ é indispensável à expressão do MHC I nas células-alvo (MARTZ; HEAGY; GROMSOWSKI, 1983; McMICHAEL, 1980). Sua ativação ocorre pelas citocinas durante o processo inflamatório transformando a miofibra em célula apresentadora de antígeno. Desta forma, a expressão de MHC I é exclusiva de miofibras DMD degeneradas, especialmente em áreas de necrose, inflamação e regeneração (APPLEYARD et al., 1985; BEHRENS et al., 1998; EMSLIE-SMITH; ARAHATA; ENGEL, 1989; KARPATI; POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989).

Sabe-se também que músculos sadios não expressam MHC II, ao contrário do que ocorre nas miofibras lesionadas (SPENCER; TIDBALL, 2001). Entretanto, alguns autores não a identificaram em indivíduos distróficos e concluíram que a expressão de MHCII limita-se aos vasos sanguíneos endomisiais e células mononucleares em áreas

de necrose, e não em fibras musculares distróficas (KARPATI; POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989).

No músculo distrófico a população de células mielóides inclui grande número de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (ARAHATA; ENGEL, 1988; CAI et al., 2000; CULLEN; FULTHORPE, 1975; GOROSPE et al., 1994; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990). Muitas dessas células são capazes de destruir fibras musculares degeneradas pela produção elevada radicais livres. Sendo assim, a perda da homeostasia devido à ausência da distrofina aumenta a sensibilidade das fibras musculares aos danos mediados por radicais livres liberados por tais células (SPENCER; TIDBALL, 2001).

Os macrófagos são o tipo celular primário envolvido nas distrofinopatias e sua depleção no camundongo mdx reduz a necrose muscular em 80% nos estágios iniciais da doença (WEHLING; SPENCER; TIDBALL, 2001). Adicionalmente, sabe-se que os macrófagos são uma população fenotipicamente diversa que pode promover o reparo tecidual como a injúria (GORDON, 2003; GRATCHEV et al., 2001; MANTOVANI et al., 2004). De acordo com a nomenclatura, macrófagos do tipo M1 são classicamente macrófagos ativados que participam da resposta imune Th1 induzindo danos ao tecido hospedeiro. Os macrófagos do tipo M2, mais diversos, participam da resposta imune Th2 e podem promover o reparo tecidual (KRIPPENDORF; RILEY, 1993; NGUYEN; TIDBALL, 2003ab; ST PIERRE; TIDBALL, 2004).

Após a injúria muscular, macrófagos são capazes de promover lesão ou reparo, de acordo com o fenótipo da resposta imune presente (Th1 ou Th2). Experimentos *in vitro* mostram que o macrófago M1 lesiona células musculares por processos mediados pela síntese do óxido nítrico e a expressão do receptor de superfície celular CD68. Tais macrófagos são os primeiros a invadirem o músculo injuriado na fase aguda (KRIPPENDORF; RILEY, 1993; NGUYEN; TIDBALL, 2003ab; ST PIERRE; TIDBALL, 2004). Em fases mais tardias, a população de macrófagos M2 que expressam marcadores dos fenótipos M2a ou M2c, como o CD163, promovem crescimento e regeneração muscular (ST PIERRE; TIDBALL, 2004; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007). O interferon- γ (IFN- γ) e a IL-4 induzem a ativação de macrófagos M1 e M2a,

respectivamente e são expressos em pacientes DMD e no camundongo mdx (LAGROTA-CANDIDO et al., 2002; LUNDBERG; BRENGMAN; ENGEL, 1995). Desta forma, a supressão dos macrófagos nos estágios iniciais da doença pode reduzir o dano muscular como demonstrado no camundongo mdx (WEHLING; SPENCER; TIDBALL, 2001). Por outro lado, supressão em estágios tardios resulta em efeito benéfico menor, devido à depleção dos macrófagos M2 que promovem o reparo tecidual (VILLALTA et al., 2009).

A regeneração no músculo distrófico

No músculo esquelético, após a remoção dos restos das fibras danificadas, a regeneração muscular ocorre pela ativação das células satélites (CS), uma subpopulação existente nas margens da miofibrila que induz a proliferação, diferenciação e fusão de mioblastos durante a miogênese (JEJURIKAR; KUZON, 2003; SILVA; PAI; CARVALHO, 2005). Contudo, o ambiente celular em que ocorre a diferenciação de CS no processo de regeneração é totalmente diferente daquele em que ocorre a miogênese, uma vez que na regeneração há o envolvimento do sistema imune e o processo depende da integridade da membrana basal e do grau da lesão das fibras musculares (SILVA; PAI; CARVALHO, 2005).

Após lesão na fibra muscular, neutrófilos e macrófagos são atraídos para o local da lesão. Essas células fagocitam os restos celulares e secretam fatores quimiotáticos que atraem CS para o local da lesão. A interação entre macrófagos e CS é mediada por citocinas, como a interleucina 6 (IL-6), secretada tanto pelo macrófago quanto pelas CS. A IL-6 promove o alinhamento das CS que proliferam e induzem a apoptose dos macrófagos e neutrófilos no local da lesão. Essa nova célula multinucleada cresce emitindo expansões citoplasmáticas. Algumas dessas estabelecem contatos com áreas viáveis do citoplasma da fibra lesada, promovendo a adesão. Nessa fase, o miotubo torna-se polarizado, cresce mais, funcionando como um *primer* que são segmentos de RNA, com 1 a 60 nucleotídeos complementares do DNA. Outros miotubos ainda não polarizados surgem nas proximidades associando-se ao miotubo *primer*. Inicialmente,

essa região da fibra apresenta vários núcleos dispostos em fileira na região central, há a formação de novas miofibrilas e posteriormente os núcleos migram para a periferia do citoplasma (SILVA; PAI; CARVALHO, 2005).

Em humanos, no músculo adulto saudável, as CS constituem cerca de 3% a 10% de todos os núcleos periféricos (MAIER; BORNEMANN, 1999). Embora a quantidade de CS no músculo esquelético seja dependente do tipo de fibra muscular, da idade e da espécie animal, seu número permanece estável em adultos que passam por repetidos ciclos de degeneração e regeneração. No entanto, seu número decresce em estados mórbidos como na DMD e deservação muscular crônica, assim como durante fenômenos fisiológicos tais como o envelhecimento. Nestas condições, a função de contração do músculo esquelético piora significativamente e a formação de novas miofibras ou reparo das existentes fica marcadamente prejudicada (JEJURIKAR; KUZON, 2003). Contrariamente, estudos em microscopia eletrônica mostraram que o número de CS aumenta nas doenças musculares em humanos, tais como DMD, polimiosites e atrofia neurogênica (ISHIMOTO et al., 1983; WAKAYAMA, 1976).

A frequência de CS e o diâmetro da fibra muscular foram investigados utilizando-se anticorpo monoclonal anti-NCAM (molécula de adesão celular neural ligada à membrana). Verificou-se que as CS são mais numerosas nas miofibras maiores, sugerindo que o ambiente também pode influenciar a progressão e a severidade da doença (MAIER; BORNEMANN, 1999).

As características dos estágios de degeneração e regeneração no músculo esquelético maduro foram bem documentadas em estudos clínicos e experimentais (CULLEN; FULTHORPE, 1982; CULLEN; HUDGSON; MASTAGLIA, 1988; HARRIS; JOHNSON; KARLSSON, 1975; HARRIS; JOHNSON, 1978). A expressão da vimentina e desmina ocorre durante a desorganização das miofibrilas nos estágios iniciais do processo de degeneração. Estas mesmas proteínas estão envolvidas na reorganização das fibras musculares durante o processo de regeneração (VATER; CULLEN; HARRIS, 1992; VATER et al., 1992).

A vimentina e a desmina são proteínas do filamento intermediário com aproximadamente 55 kDa e 53 kDa, respectivamente. Ambas são subunidades dos

filamentos intermediários dos fibroblastos e são encontradas em muitas células de origem mesenquimal. A vimentina se expressa normalmente em fibroblastos e células vasculares nos tecidos (FRANKE et al., 1978; GALLANTI et al., 1992; STEINERT; JONES; GOLDMAN, 1984).

A principal função da vimentina é ligar-se às miofibrilas adjacentes, por meio dos discos Z, no músculo esquelético imaturo e em regeneração e interconectar os corpos densos (equivalente aos discos Z) na musculatura lisa (LAZARIDES, 1980; STEINERT; JONES; GOLDMAN, 1984; TRAUB, 1985).

A desmina, outra proteína específica da musculatura esquelética e lisa, co-existe com a vimentina no músculo em desenvolvimento e em regeneração (BENNETT et al., 1979; BORNEMANN; SCHMALBRUCH, 1992; OSBORN et al., 1987; TOKUYASU; MAHER; SINGER, 1984; 1985; VATER; CULLEN; HARRIS, 1992). Quando o músculo atinge a maturidade, a expressão da vimentina é suprimida e a da desmina aumentada (VATER; CULLEN; HARRIS, 1994). No caso dos cães, a musculatura esquelética alcança a maturidade a partir dos 6 meses de idade (BRAUND; MCGUIRE; LINCOLN, 1982).

De maneira semelhante estas proteínas estão também envolvidas em várias doenças musculares (BORNEMANN; SCHMALBRUCH, 1992; CULLEN; FULTHORPE; HARRIS, 1992; SARNAT, 1991). Nos casos de DMD, a presença da vimentina foi detectada, por técnicas de imunistoquímica, de maneira forte e difusa em miofibras isoladas. Estas fibras imunorreativas eram basofílicas na coloração de Hematoxilina-eosina (HE) e consistiam de fibras em regeneração e degeneração (GALLANTI et al., 1992; VATER; CULLEN; HARRIS, 1994). Outros estudos confirmaram sua presença em fibras em degeneração e também dentro de células fagocíticas. Nas fibras em degeneração a marcação encontrava-se entre a membrana plasmática e a lâmina basal, mais precisamente no citoplasma de CS. Sabe-se que são as CS que dão origem aos mioblastos e conseqüentemente aos miotubos e miofibras após múltiplos processos de divisão (VATER; CULLEN; HARRIS, 1994).

Em outro estudo com músculos DMD foi demonstrado a presença da vimentina em 94% de fibras musculares distróficas com diâmetro inferior a 30 μm sugerindo que a grande maioria eram células em regeneração (SHIM; KIM, 2003).

Desta forma, conclui-se que a vimentina é uma proteína importante no processo de organização estrutural do sarcômero sendo recomendada como marcador confiável da regeneração de fibras musculares (GALLANTI et al., 1992).

Fator de crescimento vascular endotelial na distrofia muscular

A regeneração do músculo esquelético após a injúria é caracterizada pela proliferação e diferenciação de CS, seguida pela fusão das mesmas para formar miotubos multinucleados (PERRY; RUDNICK, 2000). Este processo foi amplamente investigado utilizando-se mioblastos C2C12, uma linhagem de células derivadas de CS murina, para estudar o crescimento muscular esquelético e sua diferenciação *in vitro*. Várias mudanças patofisiológicas associadas com a regeneração muscular esquelética foram descritas (HAWKE; GARRY, 2001). Inicialmente a lesão é caracterizada por fibroblastos, células inflamatórias e macrófagos, seguida pela remoção do tecido necrótico, revascularização e proliferação de células precursoras musculares. Os receptores para o Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) são expressos em CS e durante a isquemia em fibras em regeneração (GERMANI et al., 2003).

O Fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A), também conhecido como fator de permeabilidade vascular, é uma glicoproteína ligada a heparina de 40 a 45kD que desempenha papel chave na angiogênese fisiológica e patológica (KLAGSBRUN; D'AMORE, 1996). O VEGF induz vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e estimula a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais (CEs) (MATSUMOTO; CLAESSION-WELSH, 2001). Adicionalmente, VEGF induz a mobilização de precursores endoteliais no tecido isquêmico e/ou hipóxico diferenciando-os em células vasculares (ASAHARA et al., 1999; KALKA et al., 2000ab). A expressão do VEGF e seus receptores não está restrita a CEs vasculares, sendo também detectada nas células musculares lisas, osteoblastos, miócitos cardíacos,

miotubos em regeneração, neurônio e células tronco hematopoiéticas (DECKERS et al, 2000; GERBER et al., 2002; ISHIDA et al., 2001; RISSANEN et al., 2002; SONDELL, LUNDBORG, KANJE, 1999; TAKAHASHI et al., 1999).

Muitos estudos relataram edema de células endoteliais, replicação da membrana basal, adesão, agregação plaquetária, formação de coágulos, alterações na fibrinólise e embolia na parede de pequenos vasos nos estágios iniciais de pacientes com DMD e Distrofia muscular congênita de Fukuyama (MIIKE et al., 1989; SAITO et al, 2001; 2003; 2005; SUGINO et al, 1991). Estes resultados sugerem que o tecido muscular de pacientes distróficos pode facilmente entrar em hipóxia e isquemia devido às anormalidades da microcirculação (SAITO et al, 2009).

Sabe-se que o VEGF está envolvido em várias condições patológicas como a doença de Kawasaki, infarto cerebral e no desenvolvimento de tumores (MAENO et al., 1998; MATSUYAMA et al., 2000; SLEVIN et al., 2000). Em estudos neuromusculares, a expressão do VEGF foi documentada nas células neuronais, miócitos cardíacos e fibras musculares em regeneração (GERMANI et al., 2003; JIN, MAO, GREENBERG, 2000; SEKO et al., 1998; WAGATSUMA, TAMAKI, OGITA, 2006), além de ser encontrada no cérebro do camundongo mdx (NICO et al., 2002). Entretanto, não há estudo sobre a expressão do VEGF no músculo ou outros tecidos de pacientes com distrofia muscular (SAITO et al, 2009).

Terapias na Distrofia Muscular de Duchenne

A patologia molecular de várias distrofias musculares é diversa devido à heterogeneidade das proteínas envolvidas. Compreender o papel dessas proteínas e suas interações é essencial na pesquisa de alvos terapêuticos (BANSAL; CAMPBELL, 2004; DAVIES; NOWAK, 2006). Apesar dos grandes esforços e avanços na compreensão das bases moleculares das distrofias musculares, nenhuma cura foi ainda encontrada. O controle dos sintomas e a manutenção da habilidade motriz são, desta forma, o foco primário das intervenções clínicas (MANZUR et al., 2008). Existem várias expectativas nos avanços recentes com as terapias gênica e celular na prevenção da

degeneração muscular. O objetivo desta terapia é promover uma cópia do gene funcional ou reparar o danificado, de modo a produzir a distrofina necessária e bloquear a manifestação do fenótipo distrófico. Os métodos de introdução desse gene incluem vetores virais e não virais. Terapias celulares atuais envolvem transplante de células tronco e progenitoras que podem se fundir com miofibras existentes ou formar novas fibras musculares (MUIR; CHAMBERLAIN, 2009).

Outras modalidades terapêuticas estão em estudo, incluindo moduladores do crescimento, antiinflamatórios e agentes moduladores de sinais (BIGGAR et al., 2006; HAMED, 2006; HYSER; MENDELL, 1988; McCLOREY et al., 2006; TINSLEY et al., 1998). Os corticosteróides oferecem o único método de preservação da função muscular (BUSHBY et al, 2004; CAMPBELL; JACOB, 2003; MANZUR et al., 2008; MOXLEY et al, 2005; WONG; CHRISTOPHER, 2002). Seu mecanismo de ação é desconhecido e várias hipóteses foram propostas (MOXLEY et al, 2005). Um consenso geral defende o uso deste medicamento diariamente em meninos que ainda estão andando (BUSHBY et al, 2004; MOXLEY et al, 2005). Desta forma, dois corticosteróides, prednisona (0.75 mg/kg ao dia) e deflazacorte (0.9 mg/kg ao dia) são usados na clínica médica extensivamente. Eles parecem ser igualmente eficientes na preservação da função muscular esquelética. No entanto, esses fármacos causam efeitos indesejáveis, dentre os quais excessivo ganho de peso (MANZUR et al., 2008).

Entre outras alternativas de tratamento estão também a imunoterapia como, por exemplo, o uso do anticorpo anti-Fator de necrose tumoral α (anti-TNF α). No músculo distrófico, os mastócitos são ativados com o dano mecânico a miofibra, degranulando e liberando citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF α (COLLINS; GROUNDS, 2001; GORDON; GALLI, 1990). O TNF α é uma potente citocina pró-inflamatória que atrai leucócitos e induz a inflamação com o aumento da atividade de outras citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER; CERAMI, 1988). Pesquisas demonstraram que o uso de um anticorpo (Remicade®) que bloqueia a atividade do TNF α em camundongos mdx jovens possui forte efeito protetor na miofibras distróficas e previne a fase inicial aguda da necrose das miofibras (GROUND; TORRISI, 2004).

Outra alternativa para a terapia gênica em indivíduos com distrofia é o uso da utrofina, proteína altamente similar a distrofina em estrutura e propriedades (TINSLEY et al., 1992). Acredita-se que ela possua papel similar à distrofina no músculo e potencial para compensá-la (MATSUMURA et al. 1992; WINDER et al. 1995). Sua expressão primária ocorre nas junções musculares de músculos adultos e acredita-se que sua elevada expressão em pacientes DMD é capaz de compensar parcialmente a ausência da distrofina (KHURANA et al., 1991; MIZUNO et al., 1993; NGUYEN, 1991; WEIR, MORGAN; DAVIES, 2004). Desta forma, a entrega e regulação da utrofina endógena seriam terapias potenciais para a DMD (MUIR; CHAMBERLAIN, 2009).

Nos últimos anos, as células tronco (CT) receberam especial atenção pelo seu uso potencial nas terapias celulares nas doenças humanas, tais como leucemia e Parkinson (OWONIKOKO et al., 2007; SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007). De acordo com estas observações, muitas CT foram utilizadas no tratamento da distrofia muscular, mesmo com limitadas vantagens. Por muitos anos a CS foi considerada responsável pelo crescimento e manutenção do músculo esquelético. Com os avanços da tecnologia de isolamento celular foram identificadas outras subpopulações de células musculares e não musculares responsáveis pela miogênese (FARINI et al., 2009).

Apesar disso, mesmo após 20 anos da descoberta do gene distrofina ainda não foi encontrada uma terapia efetiva para a DMD. O desenvolvimento de terapias celulares nas doenças musculares envolve a introdução de células normais ao músculo danificado para que possam se fundir as células residentes e repovoar o músculo, melhorando a função muscular e as lesões. Sendo assim, as CT foram consideradas como a melhor ferramenta nas terapias celulares por sua capacidade de crescimento, expansão rápida, fusão com células musculares distróficas e migração por vasos alcançando tecidos e órgãos afetados (FARINI et al., 2009).

Atualmente a via de administração utilizada nas terapias por intermédio de CT, em geral, é a intramuscular, devido a sua segurança. A administração local proporciona benefícios terapêuticos aos músculos individuais ou a pequenos grupos musculares. Entretanto, a musculatura esquelética necessita de uma terapia sistêmica para ser efetiva. Combinações de vias de administração como a focal, regional e sistêmica são

opções terapêuticas viáveis para alcançar todo o sistema muscular estriado. Devemos considerar a transferência gênica, o reparo gênico e aspectos da medicina regenerativa como métodos complementares. Embora os desafios nas terapias gênicas iniciais tenham sido ineficazes, há interesse explícito de novas descobertas de terapias virais, não virais e celular, permitindo a proximidade de se descobrir um tratamento efetivo e seguro nas distrofias musculares (MUIR; CHAMBERLAIN, 2009).

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.R. Chronic Inflammation and Wound Healing. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. Saint Louis: Mosby Elsevier, 2007. Cap. 4, p. 153-191.

AMBRÓSIO, C.E.; FADEL, L.; GAIAD, T.P.; MARTINS, D.S.; ARAÚJO, K.P.C.; ZUCCONI, E.; BROLIO, M.P.; GIGLIO, R.F.; MORINI, A.C.; JAZEDJE, T.; FROES, T.R.; FEITOSA, M.L.T.; VALADARES, M.C.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B.; MEIRELLES, F.V.; MIGLINO, M.A. Identification of Three Distinguishable Phenotypes in Golden Retriever Muscular Dystrophy. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 389-396, 2009.

APPLEYARD, S.T.; DUNN, J.J.; DUBOWITZ, V.; ROSE, M.L. Increased expression of the HLA abc class I antigens by muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, inflammatory myopathy and other neuromuscular disorders. **The Lancet**, v. 16; p. 361-363, 1985.

ARAHATA, K.; ENGEL, A.G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV. Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. **Annals of Neurology**, v. 23, n. 2, p. 168-173, 1988.

ASAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; MASUDA, H.; KALKA, C.; CHEN, D.; IWAGURO, H.; INAI, Y.; SILVER, M.; ISNER, J.M. VEGF contributes to postnatal neovascularization by

mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 14, p. 3964–3972, 1999.

BANSAL, D; CAMPBELL, K.P. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 4, p. 206-213, 2004.

BAROHN, R.J. Distrofias musculares. In: BENNETT, J.C.; GOLDMAN, L. **Cecil - tratado de medicina interna**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 506, v. 2, p. 2458-2462.

BEHRENS, L.; KERSCHENSTEINER, M.; MISGELD, T.; GOEBELS, N.; WEKERLE, H.; HOHLFELD, R. Human Muscle Cells Express a Functional Costimulatory Molecule Distinct from B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) In Vitro and in Inflammatory Lesions. **The Journal of Immunology**, v. 161, n.11, p. 5943-5951, 1998.

BENNETT, G.S.; FELLINI, S.A.; TOYAMA, Y.; HOLTZER, H. Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro. **The Journal of Cell Biology**, v. 82, p. 577-584, 1979.

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

BERKE, G. The CTL's kiss of death. **Cell**, v. 81, n. 1, p. 9–12, 1995.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 505–518, 1988.

BIGGAR, W.D.; HARRIS, V.A.; ELIASOPH, L.; ALMAN, B. 2006. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. **Neuromuscular Disorders**, v. 6, n. 4, p. 249–255, 2006.

BORNEMANN, A.; SCHMALBRUCH, H. Desmin and vimentin in regenerating muscles. **Muscle & Nerve**, v. 15, n.1, p. 14-20, 1992.

BRAUND, K.G.; MCGUIRE, J.A.; LINCOLN, C.E. Observations on Normal Skeletal Muscle of Mature Dogs: a cytochemical, histochemical, and morphometric study. **Veterinary Pathology**, v.19, p.577-595, 1982.

BROOKE, M.H.; FENICHEL, G.M.; GRIGGS, R.C.; MENDELL, J.R.; MOXLEY, R.D.; MILLER, J.P.; KAISER, K.K.; FLORENCE, J.M.; PANDYA, S.; SIGNORE, L. Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy. Interesting results in a trial of prednisone. **Archives of Neurology**, v. 44, n.8, p. 812–817, 1987.

BUSHBY, K.; MUNTONI, F.; URTIZBEREA, A.; HUGHES, R.; GRIGGS, R. Report on the 124th ENMC international workshop. Treatment of Duchenne muscular dystrophy; defining the gold standards of management in the use of corticosteroids. Naarden, The Netherlands. 2–4 April 2004. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, n. 8-9, p. 526-534, 2004.

CAI, B.; SPENCER, M.J.; TSENG-ONG, L.; NAKAMURA, G.; TIDBALL, J.G. Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cells effectors. **The American Journal of Pathology**, v. 156, p. 1789-1796, 2000.

CAMPBELL, C.; JACOB, P. Deflazacort for the treatment of Duchenne Dystrophy: a systematic review. **BMC Neurol**, v. 3, n. 1, p. 7, 2003.

COLLINS, R.A.; GROUNDS, M.D. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNFalpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha (-/-) mice. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 989– 1001, 2001.

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 Neurophatologica**, v. 101, n. 5, p. 469-478, 2001.

CULLEN M.J.; FULTHORPE J.J. Stages in fiber breakdown in Duchenne muscular dystrophy. An electron-microscopic study. **Journal of the Neurological Sciences**, v.24, n. 2, p. 179-200, 1975.

CULLEN, M.J.; FULTHORPE, J.J. Phagocytosis of the A band following Z line and I band loss. Its significance in skeletal muscle breakdown. **The Journal of Pathology**, v. 138, n. 2, p. 129-143, 1982.

CULLEN, M.J.; FULTHORPE, J.J.; HARRIS, J.B. The distribution of desmin and titin in normal and dystrophic muscle. **Acta Neurophatologica**, v. 83, n. 2, p. 158-169, 1992.

CULLEN, M.J.; HUDGSON, P.; MASTAGLIA, F.L. Ultrastructural studies of diseased muscle. In: WALTON, J.N. **Disorders of Voluntary Muscle**. 5. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988. p. 284-344.

DAVIES, K.E.; NOWAK, K.J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 10, p. 762-773, 2006.

DECKERS, M.M.; KAPERIEN, M.; VAN DER BENT, C.; YAMASHITA, T.; PAPAPOULOS, S.E.; LOWIK, C.W. Expression of vascular endothelial growth factors

and their receptors during osteoblast differentiation. **Endocrinology**, v. 141, n. 5, p. 1667–1674, 2000.

DRACHMAN, D.B.; TOYKA, K.V.; MYER, E. Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. **The Lancet**, v. 14, n. 2, p. 1409–1412, 1974.

DUCHENNE, G.B. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myosclerosique. **Archives Generales de Médecine**, v.11, p. 421-552, 1868.

EDWARDS, R.H.; NEWHAM, D.J.; JONES, D.A.; CHAPMAN, S.J. Role of mechanical damage in pathogenesis of proximal myopathy in man. **The Lancet**, v. 10, n. 1, p. 548-552, 1984.

EMERY, A.E.H. Duchenne muscular dystrophy – Meryon’s disease. **Neuromuscular Disorders**, v. 3, n. 4, p. 263-266, 1993.

EMSLIE-SMITH, A.M.; ARAHATA, K.; ENGEL, A.G. Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. **Human Pathology**, v. 20, n. 3, p. 224-231, 1989.

ENGEL, A.G.; ARAHATA, K. Mononuclear cells in myopathies: Quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. **Human Pathology**, v. 17, n. 7, p. 704–721, 1986.

FARINI, A.; RAZINI, P.; ERRATICO, S.; TORRENTE, Y.; MEREGALLI, M. Cell Based Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 221, n. 3, p. 526–534, 2009.

FENICHEL, G.M.; FLORENCE, J.M.; PESTRONK, A.; MENDELL, J.R.; MOXLEY, R.C.; GRIGGS, R.C.; BROOKE, M.H.; MILLER, J.P.; ROBISON, J.; KING, W.; SIGNORE, L.; PANDYA, S.; SCHIERBECKER, J.; WILSON, B. Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 41, p. 1874–1877, 1991.

FLETCHER, S.; CARVILLE, K.S. ; HOWELL, J.M. ; MANN, C.J.; WILTON, S.D. Evaluation of a short interspersed nucleotide element in the 3' untranslated region of the defective dystrophin gene of dogs with muscular dystrophy. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 12, p. 1964-1968, 2001.

FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; OSBORN, M.; WEBER, K. Different intermediate-size filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 10, p. 5034-5038, 1978.

GALLANTI, A.; PRELLE, A.; MOGGIO, M.; CISCATO, P.; CHECCARELLI, N.; SCIACCO, M.; COMINI, A.; SCARLATO, G. Desmin and Vimentin as markers of regeneration in muscle diseases. **Acta Neurophatologica**, v. 85, p. 88–92, 1992.

GERBER, H.P.; MALIK, A.K.; SOLAR, G.P.; SHERMAN, D.; LIANG, X.H.; MENG, G.; HONG, K.; MARSTERS, J.C.; FERRARA, N. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 954–958, 2002.

GERMANI, A.; DI CARLO, A.; MANGONI, A.; STRAINO, S.; GIACINTI, C.; TURRINI, P.; BIGLIOLI, P.; CAPOGROSSI, M.C. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 4, p. 1417–1428, 2003.

GIROLAMI, U.D.; ANTHONY, D.C.; FROSCH, M.P. Nervo Periférico e Músculo Esquelético. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins – Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 29, p. 1135-1154.

GONZÁLEZ-QUINTIAL, R.; BACCALÀ, R.; POPE, R.M.; THEOFILOPOULOS, A.N. Identification of clonally expanded T cells in rheumatoid arthritis using a sequence enrichment nuclease assay. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 5, p. 1335–1343, 1996.

GORDON, J.R.; GALLI, S.J.. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 274– 276, 1990.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, 2003.

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

GOWERS, W.R. Clinical lectures on pseudohypertrophic muscular paralysis. **The Lancet**, v. 2, p. 1-2, 1879.

GRANATA, A.; VECCHI, C.; GRACIOTTI, L.; FULGENZI, G.; MAGGI, S.; CORSI, A. Gamma irradiation can reduce muscle damage in mdx dystrophic mice. **Acta Neurophatologica**, v. 96, n. 6, p. 564–568, 1998.

GRATCHEV, A.; SCHLEDZEWSKI, K.; GUILLOT, P.; GOERDT, S. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. **Skin Pharmacology and Skin Physiology**, v. 14, n. 5, p. 272–279, 2001.

GRIGGS, R.C.; MOXLEY, R.C.; MENDELL, J.R.; FENICHEL, G.M.; BROOKE, M.H.; PESTRONK, A.; MILLER, J.P. Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group. **Archives of Neurology**, v. 48, n. 4, p. 383–388, 1991.

GROUNDS, M.D.; TORRISI, J. Anti-TNF α (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 6, p. 676–682, 2004.

HALLORAN, P.F.; WADGYMAR, A.; AUTENRIED, P. The regulation of expression of major histocompatibility complex products. **Transplantation**, v. 41, n. 4, p. 413-420, 1986.

HAMED, S.A. 2006. Drug evaluation: PTC-124-a potential treatment of cystic fibrosis and Duchenne muscular dystrophy. **IDrugs: the investigational drugs journal**, v. 9, n. 11, p.783–789.

HARRIS, H.W.; GILL, T.J. Expression of Class I Transplantation Antigens. **Transplantation**, v. 42, n. 2, p. 109-117, 1986.

HARRIS, J.B.; JOHNSON, M.A. Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis seutatus scutatus*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 5, n. 6, p. 587-600, 1978.

HARRIS, J.B.; JOHNSON, M.A.; KARLSSON, E. Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 2, n. 5, p. 383-404, 1975.

HAWKE, T.J.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.:1985)**, v. 91, n. 2, p. 534–551, 2001.

HOFFMAN, E.P.; BROWN, R.H.JR.; KUNKEL, L.M. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v. 51, n. 6, 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.; KUKULAS, B.A.; PASS, D.A.; GENOVESE, L.; JOHNSEN, R.; LLOYD, F.; HOBLEY, W.E. The fulminating neonatal form of expression in the Golden Retriever dog model of Duchenne muscular dystrophy. In: International Congress on Neuromuscular Diseases, 8, 1994, New York. **The American Association of Electrodiagnostic Medicine**, 1994, Supplement 1, p. S182.

HYSER, C.L.; MENDELL, J.R. Recent advances in Duchenne and Becker muscular dystrophy. **Neurologic Clinics**, v. 6, n. 3, p. 429–453, 1988.

ISHIDA, A.; MURRAY, J.; SAITO, Y.; KANTHOU, C.; BENZAKOUR, O.; SHIBUYA, M.; WIJELATH, E.S. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 188, n. 3, p. 359–368, 2001.

ISHIMOTO, S.; GOTO, I.; OHTA, M.; KUROIWA, Y. A quantitative study of the muscle satellite cells in various neuromuscular disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 62, n. 1-3, p. 303-314, 1983.

JEJURIKAR, S.S.; KUZON Jr., W.M. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 8, n. 6, p. 573-578, 2003.

JIN, K.L.; MAO, X.O.; GREENBERG, D.A. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10242-7, 2000.

KAGI, D., VIGNAUX, F.; LEDERMAN, B.; BURKI, K.; DEPRAETERE, V.; NAGATA, S.; HENGARTNER, H.; GOLSTEIN, P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. **Science**, v. 265, n. 5171, p. 528-530, 1994a.

KAGI, D.; LEDERMANN, B.; BURKI, K.; SEILER, P.; ODERMATT, B.; OLSEN, K.J.; PODACK, E.R.; ZINKERNAGEL, R.M.; HENGARTNER, H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. **Nature**, v. 369, n. 6475, p. 31-37, 1994b.

KALKA, C.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; GORDON, R.; TEPPER, O.; GRAVEREAUX, E.; PIECZEK, A.; IWAGURO, H.; HAYASHI, S.I.; ISNER, J.M.; ASAHARA, T. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. **Circulation Research**, v. 86, n. 12, p. 1198-1202, 2000a.

KALKA, C.; TEHRANI, H.; LAUDENBERG, B.; VALE, P.R.; ISNER, J.M.; ASAHARA, T.; SYMES, J.F. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with

inoperable coronary disease. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 70, n. 3, p. 829–834, 2000b.

KARPATI G.; POULIOT Y.; CARPENTER S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. **Annals of Neurology**, v. 23, p. 64-72, 1988.

KENYON, L.C.; CURTES, M.T. Músculo Esquelético. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Rubin – Patologia – Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 27, p. 1415-1438.

KHURANA, T.S.; WATKINS, S.C.; CHAFEY, P.; CHELLY, J.; TOMÉ, F.M.; FARDEAU, M.; KAPLAN, J.C.; KUNKEL, L.M. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 1, n. 3, p. 185-194, 1991.

KISSEL, J.T.; BURROW, K.L.; RAMMOHAN, K.W.; J.R. MENDELL. Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone-treated and untreated Duchenne muscular dystrophy. CIDD Study Group. **Neurology**, v. 41, n. 5, p. 667–672, 1991.

KLAGSBRUN, M; D'AMORE, P.A. Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 7, n. 3, p. 1259-1270, 1996.

KOENIG, M.; HOFFMAN, E.P.; BERTELSON, C.J.; MONACO, A.P.; FEENER, C.; KUNKEL, L.M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell**, v. 50, n. 3, p. 509–517, 1987.

KORNEGAY, J.N.; CUNDIFF, D.D.; BOGAN, D.J.; BOGAN, J.R.; OKAMURA, C.S. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, n. 6, p. 493-500, 2003.

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, n. 10, p. 1056-1064, 1988.

KRIPPENDORF, B.B.; RILEY, D.A. Distinguishing unloading-versus reloading-induced changes in rat soleus muscle. **Muscle & Nerve**, v. 16, n. 1, p. 99–108, 1993.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Tecido de Renovação e Reparação: Regeneração, Cicatrização e Fibrose. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças – Robbins & Cotran**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap. 3, p. 91-124.

LAGROTA-CANDIDO, J.; VASCONCELLOS, R.; CAVALCANTI, M.; BOZZA, M.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. Resolution of skeletal muscle inflammation in mdx dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gamma production. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, n. 3, p. 121–132, 2002.

LATIF, N.; BAKER, M.J.; DUNN, M.J.; ROSE, M.L.; BRADY, P.; YACOUB, M.H. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and Western blotting. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 22, p. 1378-1384, 1993.

LAZARIDES, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of space. **Nature**, v. 283, p. 249-56, 1980.

LUNDBERG, I.; BRENGMAN, J.M.; ENGEL, A.G. Analysis of cytokine expression in muscle in inflammatory myopathies, Duchenne dystrophy, and non-weak controls. **Journal of Neuroimmunology**, v. 63, n. 1, p. 9–16, 1995.

MAENO, N.; TAKEI, S.; MASUDA, K.; AKAIKE, H.; MATSUO, K.; KITAJIMA, I.; MARUYAMA, I.; MIYATA, K. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in Kawasaki disease. **Pediatric Research**, v. 44, n. 4, p. 596–599, 1998.

MAIER, F.B.A.; BORNEMANN, A.M.D. Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. **Muscle & Nerve**, v. 22, p. 578-583, 1999.

MAISCH, B. Autoreactivity to the cardiac myocyte, connective tissue and the extracellular matrix in heart disease and postcardiac injury. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 11, n. 4, p. 369-395, 1989.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MANZUR, A.Y.; KUNTZER, T.; PIKE, M.; SWAN, A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane Database Systematic Reviews (online)**, v. 23, n 1, 2008: CD003725.

MARTZ, E.; HEAGY, W.; GROMSOWSKI, S.H. The mechanism of CTL mediated killing: monoclonal antibody analysis of the roles of killer and target-cell membrane proteins. **Immunological reviews**, v. 72, p. 73-96, 1983.

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, n. 6404, p. 588-591, 1992.

MATSUMOTO, T.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF receptor signal transduction. **Sciences's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 112, 1–17, 2001.

MATSUYAMA, W.; HASHIGUCHI, T.; MIZOGUCHI, A.; IWAMI, F.; KAWABATA, M.; ARIMURA, K.; OSAMI, M. Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. **Chest**, v. 118, n. 4, p. 948–951, 2000.

McCLOREY, G.; MOULTON, H.M.; IVERSEN, P.L.; FLETCHER, S.; WILTON, S.D. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression *in vitro* in a canine model of DMD. **Gene Therapy**, v. 13, n. 19, p. 1373–1381, 2006.

McDOUALL, R.M.; DUNN, M.J.; DUBOWITZ, V. Expression of class I and class II MHC antigens in neuromuscular diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 89, p. 213-26, 1989.

McDOUALL, R.M.; DUNN, M.J.; DUBOWITZ, V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 99, p. 199-217, 1990.

McMICHAEL, A.J. HLA restriction of human cytotoxic T-cells. **Springer seminars in immunopathology**, v. 3, n. 1, p. 3-22, 1980.

MIIKE, T.; SUGINO, S.; OHTANI, Y.; TAKU, K.; YOSHIOKA, K. Vascular endothelial cell injury and platelet embolism in Duchenne muscular dystrophy at the preclinical stage. **Journal of Neurological Sciences**, v. 82, n. 1-3, p. 67–80, 1987.

MIYAZATO, L.G. Distrofia Muscular no Golden Retriever, 2005. 82p. **Dissertação** (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MIZUNO, Y.; NONAKA, I.; HIRAI, S.; OZAWA, E. Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 43-52, 1993.

MONACO, A.P.; KUNKEL, L.M. Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. **Advances in Human Genetics**, v. 17, p. 61–98, 1988.

MORRISON, J.; LU, Q.L.; PASTORET, C.; PARTRIDGE, T.; BOU-GHARIOS, G. T-Cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 80, n. 6, p. 881-891, 2000.

MOXLEY, R.T.; ASHWAL, S.; PANDYA, S.; CONNOLLY, A.; FLORENCE, J.; MATHEWS, K.; BAUMBACH, L.; MCDONALD, C.; SUSSMAN, M.; WADE, C. Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. **Neurology**, v. 64, n. 1, p. 13-20, 2005.

MUIR, L.A.; CHAMBERLAIN, J.S. Emerging strategies for cell and gene therapy of the muscular dystrophies. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 11, e. 18; 2009. doi:10.1017/S1462399409001100

NEU, N.; PUMMERER, C.; RIEKER, T.; BERGER, P. T cells in cardiac myosin induced myocarditis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 68, n. 2, p. 107-110, 1993.

NGUYEN, T.M.; ELLIS, J.M.; LOVE, D.R.; DAVIES, K.E.; GATTER, K.C.; DICKSON, G.; MORRIS, G.E. Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. **Journal of Cell Biology**, v. 115, n. 6, p. 1695-1700, 1991.

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

NGUYEN, H.X.; TIDBALL, J.G. Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use. **The Journal of Physiology**, v. 550, n. 2, p. 347-356, 2003a.

NGUYEN, H.X.; TIDBALL, J.G. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells *in vitro*. **The Journal of Physiology**, v. 547, n. 1, p. 125-132, 2003b.

NICO, B.; CORSI, P.; VACCA, A.; RONCALI, L.; RIBATTI, D. Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in mdx mouse brain. **Brain Research**, v. 953, n. 1-2, p. 12-6, 2002.

OSBORN, M.; CASELITZ, J.; PÜSCHEL, K.; WEBER, K. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. **Virchows Archiv**, v. 411, n. 5, p. 449-458, 1987.

OWONIKOKO, T.; AGHA, M.; BALASSANIAN, R.; SMITH, R.; RAPTIS, A. Gemtuzumab therapy for isolated extramedullary AML relapse following allogeneic stem-cell transplant. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 4, n. 8, p. 491-495, 2007.

PAGEL, C.N.; PARTRIDGE, T. A. Covert persistence of mdx mouse myopathy is revealed by acute and chronic effects of irradiation. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 164, n. 2, p. 103–116, 1999.

PERRY, R.L.; RUDNICK, M.A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, v. 5, p. D750–D767, 2000.

PLOEGH, H.L.; ORR, H.T.; STROMINGER, J.L. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. **Cell**, v. 24, n. 2, p. 287-299, 1981.

PONDER, B.A.; WILKINSON, M.M.; WOOD, M.; WESTWOOD, J.H. Immunohistochemical demonstration of H2 antigens in mouse tissue sections. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 911-919, 1983.

RISSANEN, T.T.; VAJANTO, I.; HILTUNEN, M.O.; RUTANEN, J.; KETTUNEN, M.I.; NIEMI, M.; LEPPANEN, P.; TURUNEN, M.P.; MARKKANEN, J.E.; ARVE, K.; ALHAVA, E.; KAUPPINEN, R.A.; YLA-HERTTUALA, S. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 4, p. 1393–1403, 2002.

SAITO, T.; MATSUMURA, T.; NOZAKI, S.; SHINNO S. A case of Duchenne muscular dystrophy showing coagulation cascade activation induced by muscle destruction due to convulsion (in Japanese). **Clinical Neurology**, v. 43, n. 5, p. 274–276, 2003.

SAITO, T.; TAKENAKA, M.; MIYAI, I.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMURA, T.; NOZAKI, S.; KANG, J. Coagulation and fibrinolysis disorder in muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 24, n. 3, p. 399–402, 2001.

SAITO, T.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMURA, T.; FUJIMURA, H.; SHINNO, S. Serum levels of vascular endothelial growth factor elevated in patients with muscular dystrophy. **Brain & Development**, v. 31, n. 8, p. 612-617, 2009.

SAITO, T.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMURA, T.; NOZAKI, S.; FUJIMURA, H.; SHINNO, S. Coagulation system activated in Duchenne muscular dystrophy patients with cardiac dysfunction. **Brain & Development**, v. 27, n. 6, p. 415–418, 2005.

SARNAT, H.B. Vimentin/desmin immunoreactivity of myofibres in developmental myopathies. **Pediatrics International**, v. 33, n. 2, p. 238-246, 1991.

SEKO, Y.; TAKAHASHI, N.; TOBE, K.; UEKI, K.; KADOWAKI, T.; YAZAKI, Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) activates Raf-1, mitogen-activated protein (MAP) kinases, and S6 kinase (p90^{rsk}) in cultured rat cardiac myocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 175, n. 3, p. 239–46, 1998.

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

SHIM, J.Y; KIM, T.S. Relationship between Utrophin and Regenerating Muscle Fibers in Duchenne Muscular Dystrophy. **Yonsei Medical Journal**, v. 44, n. 1, p. 15-23, 2003.

SILVA, M.D.P.; PAI, V.D.; CARVALHO, R.F. Célula Muscular Estriada Esquelética. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. **Células – Uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole Ltda, 2005. Cap. 7, p. 83-94.

SINGH, N.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y.E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 81, n. 1, p.29–44, 2007.

SLEVIN, M.; KRUPINSKI, J.; SLOWIK, A.; KUMAR, P.; SZCZUDLIK, A.; GAFFNEY, J. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-b1 in serum of patients with acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 31, n. 8, p. 1863–1870, 2000.

SONDELL, M.; LUNDBORG, G.; KANJE, M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. **The Journal of Neuroscience: the official journal of Society of Neuroscience**, v. 19, n. 14, p. 5731–5740, 1999.

SPENCE, H.J.; CHEN, Y.J.; WINDER, S.J. Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 24, n. 6, p. 542–552, 2002.

SPENCER, M.J.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K.; TIDBALL, J.G. Helper (CD4+) and Cytotoxic (CD8+) T Cells Promote the Pathology of Dystrophin-Deficient Muscle. **Clinical Immunology**, v. 98, n. 2, p. 235–243, 2001.

SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? **Neuromuscular Disorders**, v. 11, n. 6, p. 556-564, 2001.

SPENCER, M.J.; WALSH, C.M.; DORSHKIND, K.A.; RODRIGUEZ, E.M.; TIDBALL, J. G. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 11, p. 2745–2751, 1997.

ST PIERRE, B.A.; TIDBALL, J.G. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 1, p. 290–297, 1994.

STEINERT, P.M.; JONES, J.C.R; GOLDMAN, R.D. Intermediate filaments. **The Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 1, p. 22s-27s, 1984.

SUGINO, S.; MIYATAKE, M.; OHTANI, Y.; YOSHIOKA, K.; MIIKE, T.; UCHINO, M. Vascular alterations in Fukuyama type congenital muscular dystrophy. **Brain & Development**, v. 13, n. 2, p. 77–81, 1991.

TAKAHASHI, N.; SEKO, Y.; NOIRI, E.; TOBE, K.; KADOWAKI, T.; SABE, H.; YAZAKI, Y. Vascular endothelial growth factor induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in cultured rat cardiac myocytes. **Circulation Research**, v. 84, p. 1194–1202, 1999.

TIDBALL, J.G.; ALBRECHT, D.E.; LOKENSGARD, B.E.; SPENCER, M.J. Apoptosis precedes necrosis in dystrophin-deficient muscle. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 6, p. 2197–2204, 1995.

TIDBALL, J.G.; WEHLING-HENRICKS, M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. **The Journal of Physiology**, v. 578, n. 1, p. 327–336, 2007.

TINSLEY, J.M.; BLAKE, D.J.; ROCHE, A.; FAIRBROTHER, U.; RISS, J.; BYTH, B.C.; KNIGHT, A.E.; KENDRICK-JONES, J.; SUTHERS, G.K.; LOVE, D.R.; EDWARDS, Y.H.; DAVIES, K.E. Primary structure of dystrophin-related protein. **Nature**, v. 360, n. 6404, p. 591-593, 1992.

TINSLEY, J.; DECONINCK, N.; FISHER, R.; KAHN, D.; PHELPS, S.; GILLIS, J.M.; DAVIES, K. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. **Nature Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1441–1444, 1998.

TIZARD, I.R. Células T Auxiliares e suas Respostas aos Antígenos. In: TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução**. 6. ed. São Paulo: Rocca, 2002. cap. 10, p. 108-120.

TOKUYASU, K.T.; MAHER, P.A.; SINGER, S.J. Distributions of Vimentin and Desmin in Developing Chick Myotubes in Vivo. I. Immunofluorescence Study. **The Journal of Cell Biology**, v. 98, p. 1961-1972, 1984.

TOKUYASU, K.T.; MAHER, P.A.; SINGER, S.J. Distributions of vimentin and desmin in developing chick myotubes in vivo. II. Immunoelectron microscopic study. **The Journal of Cell Biology**, v. 100, n. 4, p. 1157-1166, 1985.

TRAUB, P. **Intermediate Filaments. A Review**. Berlin: Springer-Verlag, 1985. 266 p.

UTZ, U.; McFARLAND, H.F. The role of T cells in multiple sclerosis: implications for therapies targeting the T cell receptor. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 53, n. 4, p. 351–358, 1994.

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

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, n. 1, p. 1-23, 1990.

VALENTINE, B.A.; COOPER, B.J.; CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. **Acta Neuropathologica**, v. 71, n. 3-4, p. 301-310, 1986.

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 the Neurological Sciences**, v. 88, n. 1-3 p. 69-81, 1988.

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.

VATER, R.; CULLEN, M.J.; HARRIS, J.B. The expression of vimentin in satellite cells of regenerating skeletal muscle *in vivo*. **The Histochemical Journal**, v. 26, n. 12, p. 916-928, 1994.

VATER, R.; CULLEN, M.J.; HARRIS, J.B. The fate of desmin and titin during the degeneration and regeneration of the soleus muscle of the rat. **Acta Neuropathologica**, v. 84, n. 3, p. 278-288, 1992.

VATER, R.; CULLEN, M.J.; NICHOLSON, L.V.; HARRIS, J.B. The fate of dystrophin during the degeneration and regeneration of the soleus muscle of the rat. **Acta Neuropathologica**, v. 83, n. 2, p. 140-148, 1992.

VILLALTA, S.A.; NGUYEN, H.X.; DENG, B.; GOTOH, T.; TIDBALL, J.G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 3, 2009.

WAGATSUMA, A.; TAMAKI, H.; OGITA, F. Sequential expression of vascular endothelial growth factor, Flt-1, and KDR/Flk-1 in regenerating mouse skeletal muscle. **Physiological Research**, v. 55, p. 633–640, 2006.

WAKAYAMA, Y. Electron microscopic study on the satellite cell in the muscle of Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 35, p. 532-540, 1976.

WALSH, C.M.; MATLOUBIAN, M.; LIU, C.C.; UEDA, R.; KURAHARA, C.G.; CHRISTENSEN, J.L.; HUANG, M.T.; YOUNG, J.D.; AHMED, R.; CLARK, W.R. Immune function in mice lacking the perforin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 23, p. 10854–10858, 1994.

WEHLING, M.; SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. **Journal of Cell Biology**, v. 155, n. 1, p. 123–131, 2001.

WEIR, A.P.; MORGAN, J.E.; DAVIES, K.E. A-utrophin up-regulation in mdx skeletal muscle is independent of regeneration. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, n. 1, p. 19-23, 2004.

WINDER, S.J.; HEMMINGS, L.; MACIVER, S.K.; BOLTON, S.J.; TINSLEY, J.M.; DAVIES, K.E.; CRITCHLEY, D.R.; KENDRICK-JONES, J. Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 63-71, 1995.

WONG, B.L.; CHRISTOPHER, C. Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal. **Journal of Child Neurology**, v. 17, n. 3, p. 183–90, 2002.

ZATZ, M.; VAINZOF, M.; PASSO-BUENO, M.R. Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. **Current Opinion in Neurology**, v. 13, n. 5, p. 511-517, 2000.

ZYCHLINSKY, A.; ZHENG, L.M.; LIU, C.C.; YOUNG, J.D. Cytolytic lymphocytes induce both apoptosis and necrosis in target cells. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 1, p. 393–400, 1991.

CAPÍTULO 2 – HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA NA DISTROFIA MUSCULAR DO GOLDEN RETRIEVER

RESUMO – O objetivo deste estudo foi o de caracterizar lesões musculares em cães com Distrofia Muscular do golden retriever (DMGR), de diferentes idades, por análises histopatológica e imunoistoquímica. Foram utilizados vinte e cinco cães machos classificados e distribuídos em grupos de acordo com a idade: grupo I – distróficos até 1 ano; grupo II – distróficos acima de 1 ano; grupo III - controle até 1 ano; grupo IV - controle acima de 1 ano. Uma amostra de cada músculo foi fixada em solução de formol, processadas pelas técnicas usuais de inclusão em parafina, coradas com HE e TGM para análise histopatológica e processadas para a análise imunoistoquímica de linfócitos T-CD3⁺, antígeno MHC II e vimentina. Outras amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e processadas pelas técnicas usuais para realização das reações imunoistoquímicas para marcação dos linfócitos T-CD4⁺, T-CD8⁺ e do antígeno MHC I. Os resultados mostraram que as lesões nos músculos distróficos do grupo I foram moderadas comparativamente às do grupo II que foram severas. Nos músculos distróficos, os linfócitos T-CD3⁺, T-CD4⁺ e T-CD8⁺ concentravam-se nas áreas de degeneração e necrose. O número de linfócitos T-CD3⁺ e T-CD4⁺ foi significativamente maior ($p < 0.05$) em todos os músculos distróficos em comparação aos controles, demonstrando a participação dos linfócitos T na doença. O número de linfócitos T-CD8⁺ foi significativamente maior ($p < 0.05$) nos distróficos, exceto para os músculos sartório cranial no grupo I, diafragma e bíceps femoral no grupo II. A imunoexpressão do MHC I intensificou-se com a idade nos animais distróficos, ao contrário do MHC II que se manteve. A imunoexpressão da vimentina e do VEGF nos músculos distróficos foi discreta (score 1) em todos os músculos avaliados. Destes resultados podemos concluir que no músculo distrófico a imunoexpressão do MHC I aumenta com a idade enquanto a vimentina é proporcional à intensidade dos processos inflamatório e degenerativo e não tem relação com a idade dos animais; bem como a do antígeno MHC II, VEGF e o número de linfócitos T-CD3⁺,

T-CD4⁺ e T-CD8⁺; a quantidade de células T-CD4⁺ na musculatura de cães distróficos é de uma a seis vezes maior que aquela de T-CD8⁺.

Palavras-chave: cão, distrofia muscular, golden retriever, imunoistoquímica, inflamação, lesões histopatológicas.

CHAPTER 2 – HISTOPATHOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN GOLDEN RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY

ABSTRACT – The purpose of this study was to characterize the lesions in dystrophic muscles of DMGR dogs of different ages, by means of histopathological and immunohistochemistry analysis. Twenty-five male dogs were classified and distributed into groups according to the age: Group I - dystrophic up to 1 year, group II - dystrophic over 1 year, group III - control up to 1 year, group IV - control over 1 year. One sample from each muscle was fixed in formalin solution, processed by usual techniques of paraffin embedding, stained with HE and TGM for histopathological purposes and processed for immunohistochemical analysis of the distribution of T-lymphocytes CD3⁺, MHC II and vimentin. Other samples were frozen in liquid nitrogen, processed by usual techniques of freezing in order to perform the techniques of immunohistochemical labelling for CD4⁺ T-lymphocytes, T-CD8⁺ and MHC I. The results of histopathological analysis showed that the lesions in dystrophic muscles in the Group I were moderate compared to that ones in the Group II which were severe. The CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes were more numerous in dystrophic muscles especially in areas of degeneration and necrosis. The number of CD3⁺ and CD4⁺ T-lymphocytes was found to be significantly higher ($p < 0.05$) in all dystrophic muscles compared to controls demonstrating the involvement of T-lymphocytes in the disease. The number of CD8⁺ T-lymphocytes was found to be significantly higher ($p < 0.05$) in dystrophics, except for the cranial sartorius muscles in the Group I and the diaphragm and biceps femoris in the Group II. The immunoexpression of MHC I increased with age in dystrophic animals, in contrast to MHC II that remained the same. The immunoexpression of vimentin and VEGF in the dystrophic muscles was mild (score 1) upon all muscles. From these results we can conclude that in dystrophic muscle immunoexpression of vimentin is proportional to the intensity of the inflammatory and degenerative process and it is not related to animal age; the expression of MHC II and VEGF is discreet and doesn't depend on the animal age and on the number of T-CD3⁺, T-CD4⁺ and T-CD8⁺ lymphocytes; the amount

of T-CD4⁺ cells in the dystrophic dogs muscle is between one and six times greater than the number of T-CD8⁺ lymphocytes and the MHC I expression increases with age.

Key-words: dog, golden retriever, histopathologic lesions, immunohistochemistry, inflammation, muscular dystrophy.

1. Introdução

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma desordem recessiva ligada ao cromossomo X causada por mutações genéticas, associada à ausência da distrofina, uma proteína citoesquelética que auxilia na manutenção da integridade estrutural do músculo durante o processo de contração (BERGMAN et al., 2002; COLLINS; MORGAN, 2003; GOWERS, 1879; NGUYEN et al., 2002; SHELTON et al., 2001).

O modelo animal mais usado para o estudo da DMD é o camundongo mdx (C57Bl/10ScSn), apesar das diferenças morfofuncionais entre os músculos afetados de ambas as espécies (BULFIELD et al., 1984; COLLINS; MORGAN, 2003). Vários outros modelos animais como cães, gatos, peixes e invertebrados são utilizados para o estudo comparado da DMD. Entretanto, o cão golden retriever (GR) com distrofia muscular (DM) é o mais utilizado pela similaridade das manifestações genótípicas e fenotípicas, sendo sua doença denominada Distrofia Muscular no Golden Retriever (DMGR) (COLLINS; MORGAN, 2003; COOPER et al., 1988).

Em cães com DMGR são caracterizados seis tipos de lesões nos músculos esqueléticos, incluindo alterações de diâmetro, necrose, hialinização e calcificação das fibras musculares associadas à fibrose e infiltração de tecido adiposo. A regeneração de miofibras surge nos estágios iniciais e tardios da necrose e é mais intensa nos animais jovens, enquanto que a necrose é variada nos cães distróficos de diferentes idades (MIYAZATO, 2005; NGUYEN et al., 2002; VALENTINE et al., 1990).

A necrose do músculo distrófico é uma lesão causada por dano mecânico do sarcoplasma (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987; KOENIG et al., 1987; MONACO; KUNKEL, 1988). Entretanto há evidências de que ocorram alterações mais complexas na homeostase muscular que suplantam a fraqueza mecânica (BROOKE et al., 1987; DRACHMAN; TOYKA; MYER, 1974; SPENCER et al., 2001).

A participação de células imunes no músculo deficiente em distrofina foi comprovada pelo uso de antiinflamatórios esteroidais e imunossupressores em pacientes distróficos (BROOKE et al., 1987; DRACHMAN; TOYKA; MYER, 1974; SPENCER et

al., 2001). Tal suposição motivou estudos experimentais que avaliassem o papel das células mielóides e linfóides e de seus produtos na DM (SPENCER; TIDBALL; 2001).

Os linfócitos T-CD4⁺ (células T auxiliar) e T-CD8⁺ (células T supressoras ou citotóxicas) desempenham papel importante na resposta imune adaptativa. Quando os linfócitos T-CD4⁺ ligam-se aos antígenos apresentados por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, liberam linfocinas que atraem células leucocitárias para o local da lesão. Contrariamente, os linfócitos T-CD8⁺ secretam moléculas que matam as células as quais eles se ligam. Em geral, esses linfócitos monitoram todas as células do corpo e eliminam quaisquer células que expressem fragmentos de antígenos, dentre as quais incluem-se partículas virais (ACKERMANN, 2007).

Foi demonstrado que linfócitos T, especialmente os T-CD8⁺, são os mais numerosos dentro da população de células inflamatórias no músculo distrófico (ARAHATA; ENGEL, 1988; EMSLIE-SMITH; ARAHATA; ENGEL, 1989; ENGEL; ARAHATA, 1986; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990). A participação de linfócitos T-CD8⁺ é sustentada pela melhora clínica obtida com o uso de drogas antiinflamatórias esteroidais no tratamento da DM. A prednisona deprime a imunidade mediada por linfócitos T e seu uso em pacientes DMD aumenta a força muscular e a função pulmonar e; reduz a invasão da musculatura por linfócitos T-CD8⁺ (BROOKE et al., 1987; DRACHMAN; TOYKA; MYER, 1974; FENICHEL et al., 1991; GRIGGS et al., 1991; KISSEL et al., 1991).

Apesar dos estudos demonstrarem redução de danos ao tecido distrófico com a depleção de T-CD8⁺; acredita-se também na participação de células T-CD4⁺ na promoção das lesões (SPENCER et al., 1997). Foram verificadas reduções significativas das lesões musculares em 61% e 75% dos animais distróficos imunossuprimidos para T-CD4⁺ e T-CD8⁺, respectivamente (SPENCER et al., 2001). Tais resultados reforçam a participação de células T na DM e sugerem que terapias imunossupressoras possam proporcionar benefícios aos pacientes DMD (SPENCER et al., 2001).

Outro papel importante da atuação do sistema imune cabe ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC), que se expressa na superfície das células nucleadas dos

mamíferos. O MHC é constituído por proteínas específicas de membrana e é indispensável para a ação citotóxica de linfócitos (HALLORAN; WADGYMAR; AUTENRIED, 1986; HARRIS; GILL, 1986; MARTZ; HEAGY; GROMSOWSKI, 1983; McMICHAEL, 1980; PLOEGH; ORR; STROMINGER, 1981).

Os produtos do gene do MHC são subdivididos em classe I (MHC I) e classe II (MHC II) e podem ser identificados com o uso de anticorpos monoclonais específicos em culturas e suspensões celulares, cortes de tecidos e imunoblots teciduais homogeneizados (PONDER et al., 1983). No tecido muscular sua expressão normalmente se dá na superfície de vasos sanguíneos e capilares (APPLEYARD et al., 1985; EMSLIE-SMITH; ARAHATA; ENGEL, 1989; KARPATI; POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989).

Para que ocorra a ação citotóxica de linfócitos T CD8⁺ é indispensável à expressão do MHC I nas células-alvo (MARTZ; HEAGY; GROMSOWSKI, 1983; McMICHAEL, 1980). Sua ativação ocorre pelas citocinas durante o processo inflamatório transformando a miofibra em uma célula apresentadora de antígeno, sendo ausente no músculo normal. Desta forma, a expressão de MHC I é exclusiva de miofibras DMD degeneradas, especialmente em áreas de necrose, inflamação e regeneração (APPLEYARD et al., 1985; BEHRENS et al., 1998; EMSLIE-SMITH; ARAHATA; ENGEL, 1989; KARPATI; POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989) e sua detecção imunohistológica no sarcolema serve como ferramenta no diagnóstico das miopatias inflamatórias (PAS et al., 2004).

A expressão do antígeno MHC II não foi evidenciada em miofibras de indivíduos com desordens neuromusculares e limita-se aos vasos sanguíneos endomisiais e células mononucleares das áreas de necrose (KARPATI; POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989).

A vimentina é uma proteína de filamento intermediário com aproximadamente 55 kDa (FRANKE et al., 1978). Sua principal função é ligar as miofibrilas adjacentes no músculo esquelético em desenvolvimento, imaturo e em regeneração (LAZARIDES, 1980; STEINERT; JONES; GOLDMAN, 1984; TRAUB, 1985). A expressão da vimentina ocorre durante a desorganização das miofibrilas nos estágios iniciais do processo de

degeneração. Esta mesma proteína está envolvida na reorganização das fibras musculares durante o processo de regeneração (VATER; CULLEN; HARRIS, 1992; VATER et al., 1992). Assim, a vimentina é detectada na DMD nas fibras em regeneração ou degeneração, sendo-lhe atribuída importante papel no processo de organização estrutural do sarcômero e por isso recomendada como um marcador confiável da regeneração de fibras musculares (GALLANTI et al., 1992; VATER; CULLEN; HARRIS, 1994).

O Fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A), também conhecido como fator de permeabilidade vascular, é uma glicoproteína ligada a heparina de 40 a 45kD que desempenha papel chave na angiogênese fisiológica e patológica (KLAGSBRUN; D'AMORE, 1996). O VEGF induz vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais (CEs) (MATSUMOTO; CLAESSON-WELSH, 2001). Adicionalmente, VEGF induz a mobilização de precursores endoteliais no tecido isquêmico e/ou hipóxico diferenciando-os em células vasculares (ASAHARA et al., 1999; KALKA et al., 2000). Em estudos neuromusculares, a expressão do VEGF foi documentada nas células neuronais, miócitos cardíacos e fibras musculares em regeneração (GERMANI et al., 2003; JIN, MAO, GREENBERG, 2000; SEKO et al., 1998; WAGATSUMA, TAMAKI, OGITA, 2006), além de ser encontrado no cérebro do camundongo mdx (NICO et al., 2002). Entretanto na literatura consultada, não há estudo sobre a expressão do VEGF no músculo ou outros tecidos de pacientes com distrofia muscular (SAITO et al, 2009).

Assim, o objetivo deste estudo foi o de caracterizar lesões na musculatura distrófica em cães com DMGR, de diferentes idades, por intermédio de análises histopatológica e imunoistoquímica.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

O material utilizado no presente estudo foi obtido do banco de fragmentos musculares proveniente de pesquisa anterior realizada no laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp/Jaboticabal. Foram utilizadas amostras de vinte e cinco cães machos com idade entre 2 e 84 meses provenientes da mesma colônia situada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP – São Paulo e na Associação dos Amigos da Distrofia Muscular – Ribeirão Preto – São Paulo. Estes foram classificados em distróficos e controle com base na análise do DNA genômico² e distribuídos como se segue: grupo I – animais distróficos de até 1 ano de idade (n=10); grupo II – animais distróficos acima de 1 ano de idade (n=7) e; grupo III - grupo controle formado por animais não-distróficos e livres de anormalidades neuromusculares de até 1 ano de idade (n=5); grupo IV - grupo controle formado por animais não-distróficos e livres de anormalidades neuromusculares acima de 1 ano de idade (n=3). Esta classificação está exposta no apêndice A.

2.2. Colheita e processamento das amostras

As amostras dos músculos controles e distróficos foram colhidas até no máximo 6 horas após a morte dos animais. Os animais distróficos e controles tiveram morte natural.

Foram colhidas duas amostras de cada um dos músculos da região medial do masseter, costal do diafragma, bíceps braquial, cabeça longa do tríceps braquial, semitendinoso, semimembranoso, cabeça superficial do bíceps femoral e sartório cranial. Para análise das lesões, uma amostra de cada músculo foi fixada em solução de formol tamponado a 10% em pH 7.4 e a seguir processada pelas técnicas usuais de inclusão em parafina, cortada (3 µm de espessura) e corada com hematoxilina-eosina

² kit comercial GFX Genomic Blood DNA Purification Kit – Amershan Pharmacia

(HE) e tricrômio de Gomori modificado (TGM). Para a análise imunoistoquímica, músculos incluídos em parafina também foram utilizados para os anticorpos anti-CD3, anti-MHC II e anti-vimentina.

As outras amostras foram imersas e congeladas em n-hexano³ e estocadas em nitrogênio líquido até a realização da técnica de imunoistoquímica. Na seqüência, cortes transversos seriados (espessura 8 µm) foram realizados em criostato⁴ a -20°C, montados em lâminas contendo Poly-L-lisina a 10%⁵ para posterior realização das técnicas imunoistoquímicas com os anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-MHC I e anti-VEGF.

2.3. Análise histológica das lesões

Para caracterizar as lesões foi utilizado o método de análise qualitativa levando em consideração a porcentagem de miofibras alteradas em relação ao corte muscular (NGUYEN et al., 2002). Quatro graus de lesões foram identificados segundo a extensão do dano na miofibra nos cortes corados com HE e TGM (Tabela 01).

Tabela 01. Graus de lesão para músculos distróficos corados com HE e TGM.

Grau	Lesão	Características Histológicas
0	ausente	músculo apresentando as mesmas características histológicas vistas em músculos normais sem a presença de anormalidades
1	discreta	fibras musculares danificadas isoladas e aleatoriamente distribuídas
2	moderada	fibras musculares danificadas em grupo apresentado distribuição multifocal e afetando 10-50% das miofibras em cada corte muscular
3	severa	fibras musculares danificadas coalescentes ou difusas afetando mais de 50% das miofibras em cada corte muscular

³ Labsynth Co, Diadema, SP, BR

⁴ Damon/IEC Division 3398 Microtome Cryostat

⁵ Cód. P4832 - Sigma Chemical Co., St Louis, MO EUA

2.4. Análise imunoistoquímica

O método imunoistoquímico utilizado foi o complexo estreptoavidina-biotina peroxidase (ABC) (HSU et al., 1981). Sete anticorpos primários foram utilizados para se avaliar a expressão de linfócitos T-CD3, T-CD4, T-CD8, vimentina, MHC I e II nos diferentes grupos experimentais (Tabela 02).

Tabela 02. Especificações dos anticorpos empregados nas reações de imunoistoquímica. Método ABC. Jaboticabal, SP, 2010.

Anticorpos primários	Clone	Diluição	Código	Marca	Controle
CD3	policlonal	1/100	A0452	Dako	linfonodo
CD4	monoclonal	1/80	DH29A	VMRD	linfonodo
CD8	monoclonal	1/80	CADO46A	VMRD	linfonodo
MHC I	monoclonal	1/240	H58	VMRD	cólon
MHC II	monoclonal	1/400	M0746	Dako	linfonodo
Vimentina	monoclonal	1/200	M7020	Dako	útero
VEGF	monoclonal	1/20	V4758	Sigma-Aldrich	ovário

As reações com os anticorpos primários tiveram como controles positivos linfonodo (CD3, CD4, CD8 e MHC II), cólon (MHC I), útero (vimentina) e ovário (VEGF) caninos obtidos de necropsias realizadas no departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp/Jaboticabal. Como controles negativo foram realizadas todas as etapas das reações na ausência dos anticorpos primários e secundários.

As lâminas com cortes parafinados foram mantidas em estufa a 60°C por 60 minutos e, em seguida, passaram por desparafinização em xilol e hidratação em concentrações decrescentes de etanol. Após lavagem em água destilada foi realizada recuperação antigênica pelo calor com o tampão citrato (pH 6,0) em panela elétrica a vapor para os anticorpos primários anti-CD3, anti-vimentina e anti-MHC II. Após o resfriamento das lâminas por 30 minutos à temperatura ambiente e lavagem em tampão salina fosfato (PBS), pH 7,4, por 3 minutos, foi realizado bloqueio da atividade endógena da peroxidase por meio da imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio a 2% em metanol e solução de PBS (pH 7,4) por 10 minutos. Na seqüência foram realizadas 2 lavagens em PBS (pH 7,4) por 1 minuto e 2 lavagens em solução tampão

tris salina Tween 20 (TBST) (pH 7,4) por 1 minuto. A seguir, procedeu-se o bloqueio dos antígenos inespecíficos com soro albumina bovina a 2%⁶ em PBS (pH 7,4) por 30 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário durante toda noite (de 12 a 18 horas) à temperatura ambiente.

Subseqüentemente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado universal⁷, e posteriormente, com o complexo ABC⁸ por 30 minutos cada. As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina⁹ e contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos.

Após a incubação do anticorpo primário, entre as duas etapas anteriores e após o complexo ABC foram realizadas três lavagens das lâminas histológicas em TBST (pH 7,4) com duração de um minuto cada. No complexo ABC ainda foram acrescentadas mais três lavagens com solução tampão tris HCl (pH 7,6).

A desidratação dos cortes foi feita em concentrações crescentes de álcoois e xilóis, seguidas pela montagem em lamínula em meio permanente Entellan¹⁰.

Os cortes congelados foram diretamente fixados em acetona gelada por 10 minutos e, em seguida, lavados três vezes em PBS (pH 7,4) por 5 minutos, exceto para o MHC I onde foi utilizado TBST. A partir desta etapa os demais procedimentos foram iguais aos dos cortes parafinados.

2.4.1. Avaliação imunoistoquímica

Imunomarcção de T-CD3, T-CD4 e T-CD8

Para a análise quantitativa de células inflamatórias imunomarcadas para os anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 foram aleatoriamente avaliados cinco campos por corte e com auxílio de um retículo micrométrico¹¹ em objetiva de 40 foram contadas todas as células imunomarcadas.

⁶ Sigma-Aldrich, St Louis, EUA

⁷ Universal LSAB™, Dako® K0690, Carpinteria, CA, USA

⁸ Kit HRP, Dako® K0690, Carpinteria, CA, USA

⁹ Líquido de DAB+, Dako® K3468, Carpinteria, CA, USA

¹⁰ Merck Chemicals, cód.107961, Darmstadt, Germany

¹¹ Nikon, Inc. – Japan

Imunomarcaco da vimentina, VEGF e antgeno MHC II

Para caracterizar a imunomarcaco dos anticorpos anti-vimentina, anti-VEGF e anti-MHC II quantificou-se subjetivamente o padro de distribuico da reaco observada nos cortes musculares. Sendo assim foram estabelecidos trs escores de imunomarcaco segundo sua extenso nos cortes musculares (Tabela 03).

Tabela 03. Padro de distribuico das imunomarcaces nos msculos distrficos para deteco dos anticorpos anti-vimentina, anti-VEGF e anti-MHC II.

Escore	Imunomarcaco	Caractersticas Histolgicas
0	zero	sem alteraces morfolgicas dignas de nota
1	discreta	imunomarcaces isoladas e aleatoriamente distribudas
2	moderada	imunomarcaces agrupadas com distribuico multifocal
3	acentuada	imunomarcaces coalescentes ou difusas por todo o corte muscular

Na avaliao da vimentina no foram utilizados os animais abaixo de 6 meses de idade (n=2) devido a imaturidade da musculatura esqueltica de ces nessa faixa etria (BRAUND; MCGUIRE; LINCOLN, 1982).

Imunomarcaco do antgeno MHC I

Para caracterizar a imunomarcaco do anticorpo anti-MHC I utilizou-se o mesmo procedimento anterior, entretanto este foi baseado na intensidade da reaco nos cortes musculares e no padro de distribuico das marcaes. Sendo assim a intensidade da reaco foi classificada em escore de 1 a 3 cruces indicando marcaes fracas, moderadas e intensas.

2.5. Anlise Estatstica

A normalidade das amostras foi submetida  prova de ajuste  curva Normal de Kolmogorov-Smirnov, no apresentando distribuico normal (BISQUERRA; SARRIERA; MARTNEZ, 2004). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo mtodo de

Mann-Whitney, ao nível de 5% de significância e os cálculos processados pelo pacote estatístico SPSS¹².

3. RESULTADOS

3.1. Análise histológica das lesões

Todos os músculos dos animais distróficos de diferentes idades apresentaram-se lesionados. A coloração HE possibilitou visibilizar alterações degenerativas dentre as anormalidades mais comuns. Variações no diâmetro das fibras, aparência escura (hialinização) e infiltração mononuclear foram freqüentes (Figura 1A e 1B). Necrose isolada ou agrupada das miofibras foi identificada (Figura 1A). Infiltrado inflamatório de células mononucleares distribuído pelo interstício ou margeando fascículos, mostrou intensidade que variou de discreta a intensa (Figura 1A). Miofibras em regeneração apresentaram diâmetro pequeno, citoplasma basofílico e núcleo grande e vesicular. Calcificação distrófica e infiltração de gordura interfascicular foram ocasionais (Figura 1B).

A coloração de TGM revelou moderado a pronunciado tecido conectivo perimisial e endomisial (Figura 1C). Foram observadas fibras "ragged-red fibres" isoladas ou em grupos que se caracterizaram por apresentar aspecto granular vermelho-azulado em seu sarcoplasma (Figura 1C). Estes grânulos representam acúmulos de mitocôndrias que se originam na tentativa de produzir mais energia para a célula (ENGEL; CUNNINGHAM, 1963; SHELTON et al., 2001).

¹² Versão 12.0 – LEAD Technologies, Inc. – 2003

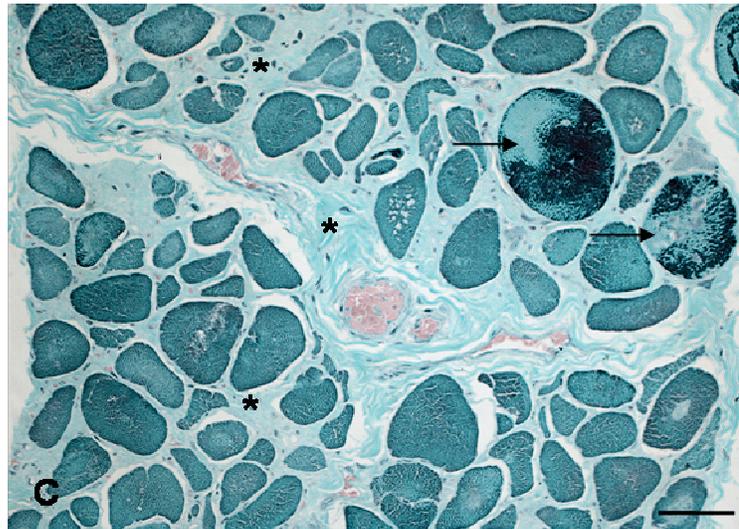
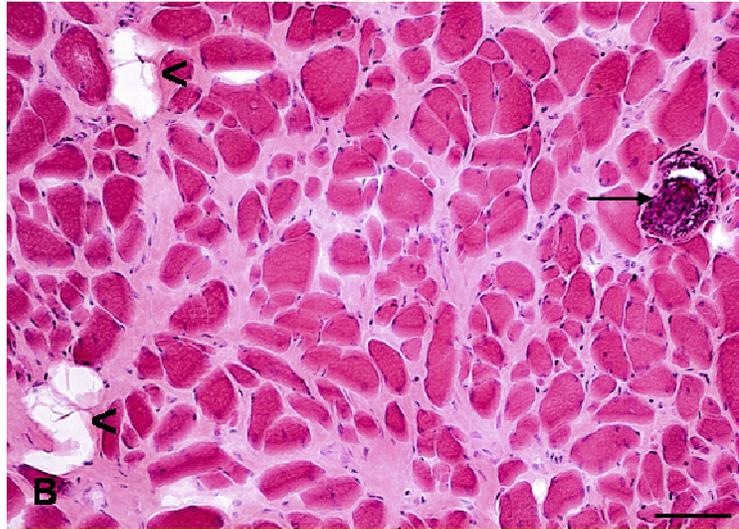
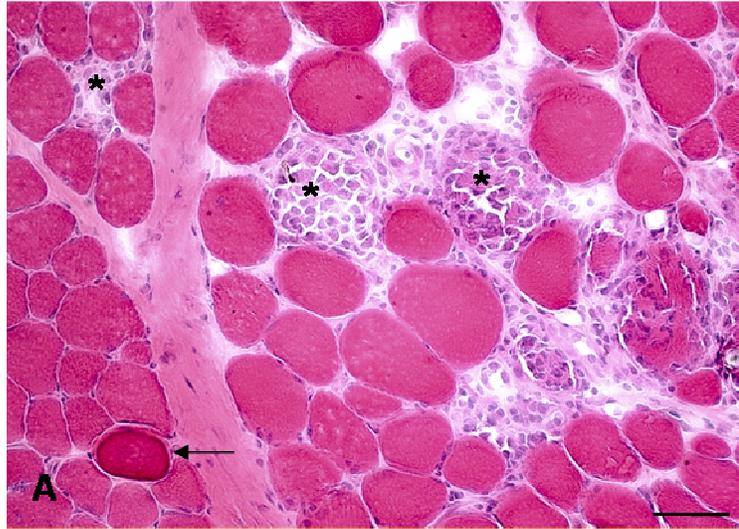


Figura 1. Lesões musculares em cães com DMGR. **A.** Músculo masseter. Miofibras com variações no diâmetro, aparência escura (seta), necrose de miofibras e células inflamatórias distribuídas pelo interstício (*). HE. **B.** Músculo bíceps braquial. Calcificação distrófica (seta) e infiltração de gordura interfascicular (<). HE. **C.** Músculo semitendinoso. Fibras "ragged-red fibres" (seta) e fibrose perimisial e endomisial acentuada (*). TGM. Barra = 50 µm.

As lesões nos músculos distróficos de animais do grupo I foram moderadas - grau de lesão 2 em 62,5% dos músculos – quando comparadas as do grupo II, severas - grau de lesão de 3 em 87,5% dos músculos (Tabelas 04 e 05).

Tabela 04. Mediana e desvio padrão dos graus de lesões encontrados nos grupos distróficos de diferentes idades. Jaboticabal, SP, 2010.

Músculo	Grupo I (até 1 ano de idade)	Grupo II (acima de 1 ano de idade)
Masseter	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.7
Diafragma	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.4
Biceps braquial	3.0 ± 0.8	3.0 ± 0.5
Triceps braquial	2.0 ± 0.6	3.0 ± 0.5
Semitendinoso	3.0 ± 0.5	3.0 ± 0.5
Semimembranoso	2.0 ± 0.5	3.0 ± 0.5
Biceps femoral	2.0 ± 0.6	3.0 ± 0.5
Sartorio cranial	2.0 ± 0.5	3.0 ± 0.4

Tabela 05. Freqüência (%) dos graus de lesões encontrados nos grupos distróficos de diferentes idades. Jaboticabal, SP, 2010.

Grau de lesão	Grupo I (até 1 ano de idade)	Grupo II (acima de 1 ano de idade)
1	0.0%	0.0%
2	62.5%	12.5%
3	37.5%	87.5%

3.2. Estudo imunoistoquímico

3.2.1. Imunomarcção de linfócitos T-CD3, T-CD4 e T-CD8

A análise da distribuição das células inflamatórias linfocíticas CD3, CD4 e CD8 nos músculos controles evidenciou células isoladas e aleatoriamente distribuídas pelo endomísio, perimísio e ao redor de vasos. Entretanto, estas células foram mais numerosas nas áreas de degeneração e necrose dos músculos distróficos (Figura 2).

O número de linfócitos T-CD3 e T-CD4 foi significativamente maior ($p < 0.05$) em todos os oito músculos distróficos analisados quando comparados aos controle, demonstrando a participação dos linfócitos T na doença (Tabelas 06 e 07).

Por outro lado, o número de linfócitos T-CD8 foi significativamente maior nos músculos distróficos quando comparados aos controle, com exceção dos músculos sartório cranial (grupo I), diafragma (grupo II) e bíceps femoral (grupo II) onde não foram encontradas diferenças significativas ao nível de 5% ($p < 0.05$) (Tabela 08). Este número significativo de linfócitos T-CD8 aumentados também comprova a participação deste tipo celular na DMGR.

Apesar destes resultados, a análise estatística não mostrou diferenças significativas na expressão dos três anticorpos entre os dois grupos de animais distróficos, indicando que o fator idade não interferiu no número de linfócitos T-CD3, T-CD4 e T-CD8 (Tabelas 06, 07 e 08).

Tabela 06. Média e erro padrão do número de linfócitos T-CD3 por 0,0052 mm² nos músculos dos grupos controle e distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.

Músculo	Distróficos		Controles	
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Masseter	8,6 ± 0,5	8,1 ± 0,9	1,1 ± 0,2	3,0 ± 0,6
Diafragma	3,8 ± 0,2	3,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,8 ± 0,3
Biceps braquial	3,8 ± 0,3	3,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2
Triceps braquial	3,8 ± 0,3	4,6 ± 0,5	1,1 ± 0,2	1,8 ± 0,3
Semitendinoso	4,6 ± 0,2	4,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Semimembranoso	5,6 ± 0,3	5,7 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
Biceps femoral	3,7 ± 0,3	3,8 ± 0,3	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Sartorio cranial	4,4 ± 0,3	5,8 ± 1,1	0,4 ± 0,2	1,1 ± 0,2

Grupo I – animais distróficos até 1 ano de idade; grupo II – animais distróficos acima de 1 ano de idade; grupo III - animais controles até 1 ano de idade; grupo IV - animais controles acima de 1 ano de idade.

Tabela 07. Média e erro padrão do número de linfócitos T-CD4 por 0,0052 mm² nos músculos dos grupos controle e distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.

Músculo	Distróficos		Controles	
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Masseter	15,0 ± 1,7	15,0 ± 3,5	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,3
Diafragma	15,7 ± 1,1	17,3 ± 1,1	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Biceps braquial	32,6 ± 2,5	29,4 ± 2,7	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,2
Triceps braquial	32,5 ± 1,6	30,3 ± 1,6	1,6 ± 0,4	1,4 ± 0,3
Semitendinoso	37,3 ± 4,2	27,5 ± 4,5	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,4
Semimembranoso	16,3 ± 1,1	14,8 ± 0,5	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2
Biceps femoral	27,9 ± 2,5	25,8 ± 1,4	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Sartorio cranial	17,4 ± 1,7	19,3 ± 1,9	1,8 ± 0,3	0,8 ± 0,2

Grupo I – animais distróficos até 1 ano de idade; grupo II – animais distróficos acima de 1 ano de idade; grupo III - animais controles até 1 ano de idade; grupo IV - animais controles acima de 1 ano de idade.

Tabela 08. Média e erro padrão do número de linfócitos T-CD8 por 0,0052 mm² nos músculos dos grupos controle e distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.

Músculo	Distróficos		Controles	
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Masseter	6,6 ± 0,6	6,7 ± 1,2	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,3
Diafragma	6,1 ± 0,6	3,8 ± 0,4 *	3,8 ± 0,2	6,0 ± 1,0 *
Biceps braquial	6,6 ± 0,7	6,3 ± 0,8	2,4 ± 0,3	1,8 ± 0,3
Triceps braquial	9,2 ± 0,9	8,0 ± 1,0	2,6 ± 0,4	2,8 ± 0,4
Semitendinoso	9,1 ± 1,3	9,0 ± 3,1	2,6 ± 0,3	3,9 ± 0,3
Semimembranoso	11,3 ± 2,3	10,1 ± 1,3	2,4 ± 0,2	2,7 ± 0,2
Biceps femoral	11,3 ± 6,0	12,7 ± 2,2 *	4,0 ± 0,3	3,9 ± 0,3 *
Sartorio cranial	3,5 ± 0,5 *	3,2 ± 0,4	2,1 ± 0,4 *	1,8 ± 0,3

* não houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre animais distróficos e controles.

Grupo I – animais distróficos até 1 ano de idade; grupo II – animais distróficos acima de 1 ano de idade; grupo III - animais controles até 1 ano de idade; grupo IV - animais controles acima de 1 ano de idade.

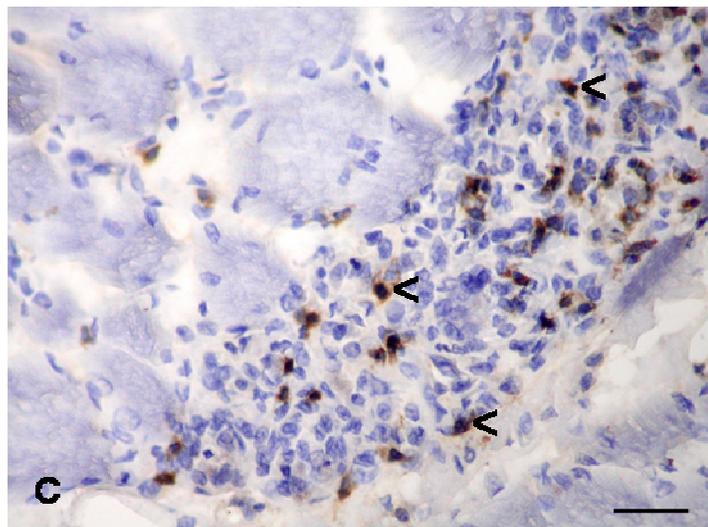
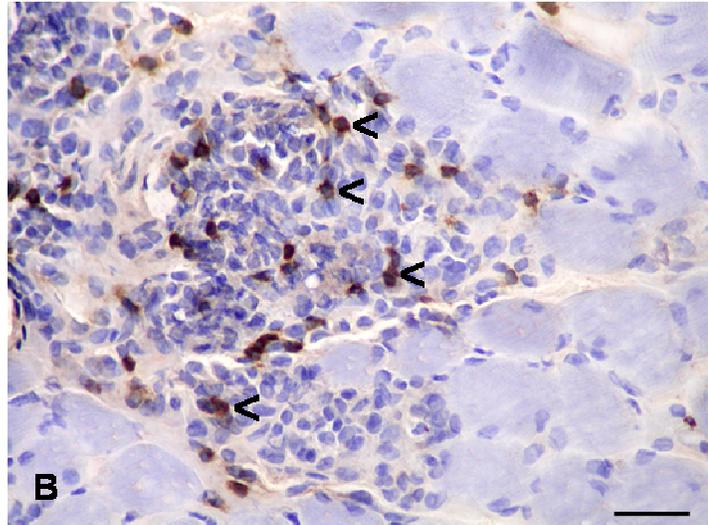
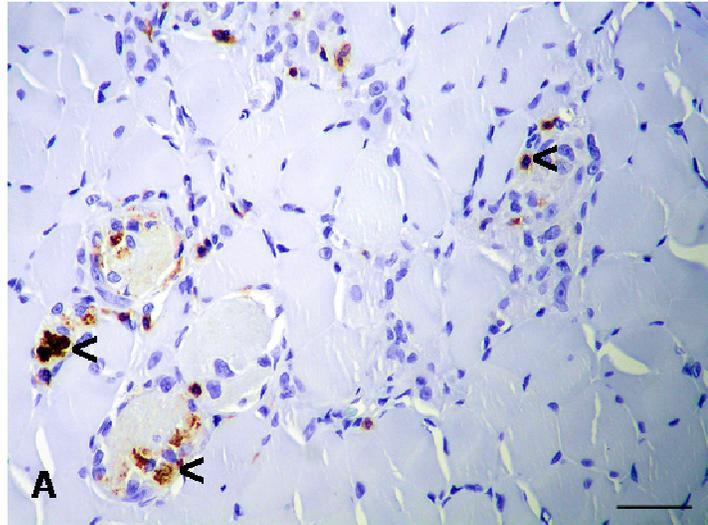


Figura 2. Reação imunoistoquímica para detecção de linfócitos T em músculos distróficos. **A.** Músculo masseter expressando T-CD3 (<). **B.** Músculo diafragma expressando T-CD4 (<). **C.** Músculo semitendinoso expressando T-CD8 (<). Método ABC. Barra = 50 µm.

3.2.2. Imunomarcação do antígeno MHC I

Na análise dos músculos controles a expressão do antígeno MHC I ocorreu na superfície de vasos sangüíneos e capilares e, nos distróficos na superfície das miofibras e em áreas de necrose, regeneração e inflamação (Figura 3).

As imunomarcações do MHC I nos animais distróficos do grupo I foram intensas em quatro dos oito músculos avaliados (50,0% - bíceps femoral, sartório cranial, bíceps e tríceps braquial), seguidas de marcações moderadas (37,5% - masseter, diafragma e semimembranoso) e discretas (12,5% - semitendinoso). No grupo II foram intensas nos oito músculos avaliados (100%) (Tabela 09).

Verificou-se relação direta entre a intensidade da marcação de MHC I e a idade, indicando ação promotora do antígeno MHC I para atuação dos linfócitos T-CD8.

Tabela 09. Grau de intensidade da imunoexpressão do antígeno MHC I, erro padrão (EP), valores mínimo e máximo nos músculos dos grupos distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.

Músculo	Grupo I (1 ano de idade)			Grupo II (acima de 1 ano de idade)		
	Média ± EP	Mínimo	Máximo	Média ± EP	Mínimo	Máximo
Masseter	3.0 ± 0.2	2.0	3.0	3.0 ± 0.2	2.0	3.0
Diafragma	2.5 ± 0.5	1.0	3.0	3.0 ± 0.0	3.0	3.0
Biceps braquial	2.5 ± 0.3	2.0	3.0	3.0 ± 0.0	3.0	3.0
Triceps braquial	3.0 ± 0.2	2.0	3.0	3.0 ± 0.4	1.0	3.0
Semitendinoso	2.0 ± 0.6	1.0	3.0	3.0 ± 0.2	2.0	3.0
Semimembranoso	2.0 ± 0.6	1.0	3.0	3.0 ± 0.0	3.0	3.0
Biceps femoral	3.0 ± 0.4	1.0	3.0	3.0 ± 0.0	3.0	3.0
Sartório cranial	2.5 ± 0.3	2.0	3.0	3.0 ± 0.0	3.0	3.0

Intensidade da coloração: 1 = fraca, 2 = moderada, 3 = forte.

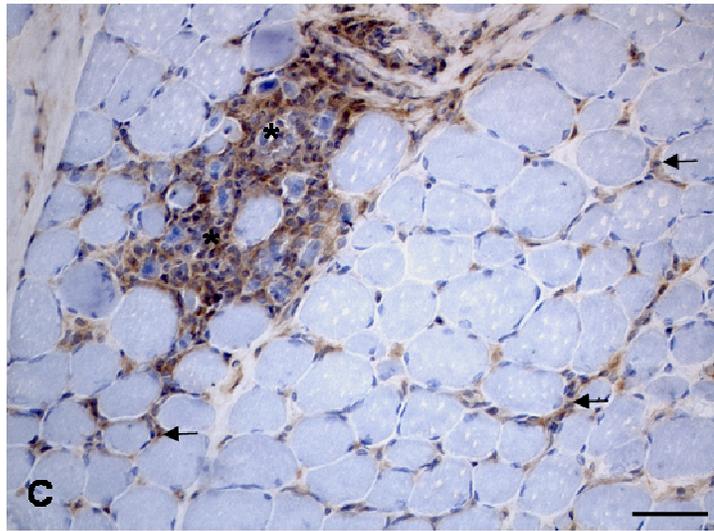
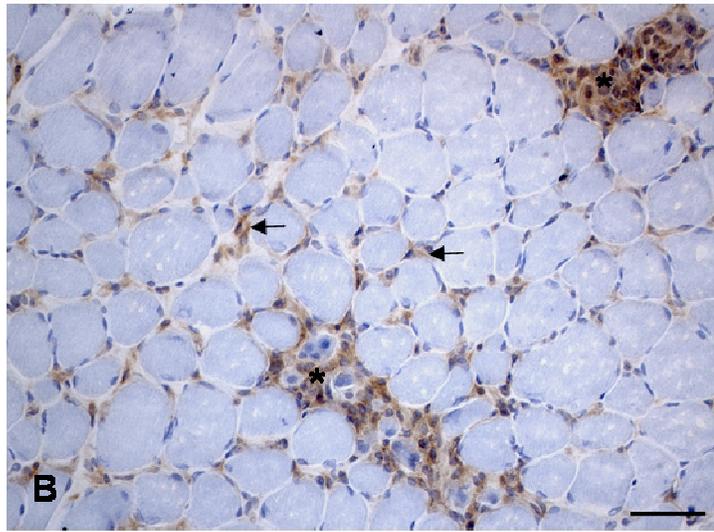
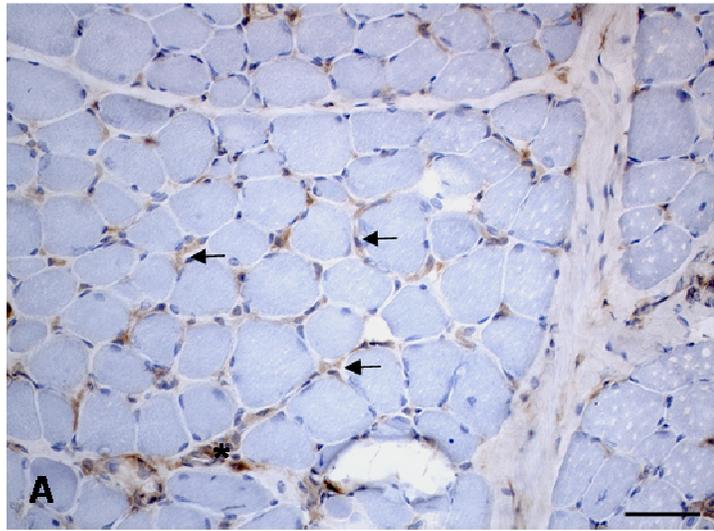


Figura 3. Imunomarcações do antígeno MHC I na superfície de miofibras (seta) e áreas de necrose e inflamação (*) nos músculos distróficos de cães golden retriever. **A.** Músculo diafragma - marcações fracas. **B.** Músculo masseter - marcações moderadas. **C.** Músculo semitendinoso - marcações intensas. Método ABC. Barra = 50 μm .

3.2.3. Imunomarcção do antígeno MHC II

Nos músculos controle o MHC II foi evidenciado na superfície de células inflamatórias mononucleares distribuídas aleatoriamente no endomísio, ao redor e na parede dos vasos sanguíneos.

Nos músculos distróficos a imunoexpressão do MHC II ocorreu nas células inflamatórias mononucleares, especialmente fagócitos, concentradas em áreas de degeneração e necrose e em miofibras sendo fagocitadas (Figura 4). Nos músculos distróficos de ambos os grupos avaliados (I e II) a média de imunomarcção foi discreta (escore 1), demonstrando que a expressão do MHC II não variou com a idade dos animais distróficos (Tabela 10, Figura 4A).

Tabela 10. Escores médios, erro padrão (EP), mínimos e máximos da imunoexpressão do MHC II dos músculos dos grupos distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.

Músculo	Grupo I (até 1 ano de idade)			Grupo II (acima de 1 ano de idade)		
	Média ± EP	Mínimo	Máximo	Média ± EP	Mínimo	Máximo
Masseter	1.0 ± 0.3	0.0	3.0	1.0 ± 0.2	0.0	1.0
Diafragma	1.0 ± 0.2	0.0	2.0	1.0 ± 0.2	0.0	1.0
Biceps braquial	1.0 ± 0.1	0.0	1.0	1.0 ± 0.2	0.0	1.0
Triceps braquial	1.0 ± 0.1	0.0	1.0	1.0 ± 0.3	0.0	2.0
Semitendinoso	1.0 ± 0.2	0.0	1.0	1.0 ± 0.2	0.0	2.0
Semimembranoso	1.0 ± 0.2	0.0	1.0	0.5 ± 0.2	0.0	1.0
Biceps femoral	1.0 ± 0.2	0.0	1.0	1.0 ± 0.2	0.0	1.0
Sartorio cranial	1.0 ± 0.2	0.0	1.0	1.0 ± 0.2	0.0	1.0

Escores de imunomarcção: 0 = zero, 1 = discreta, 2 = moderada, 3 = acentuada.

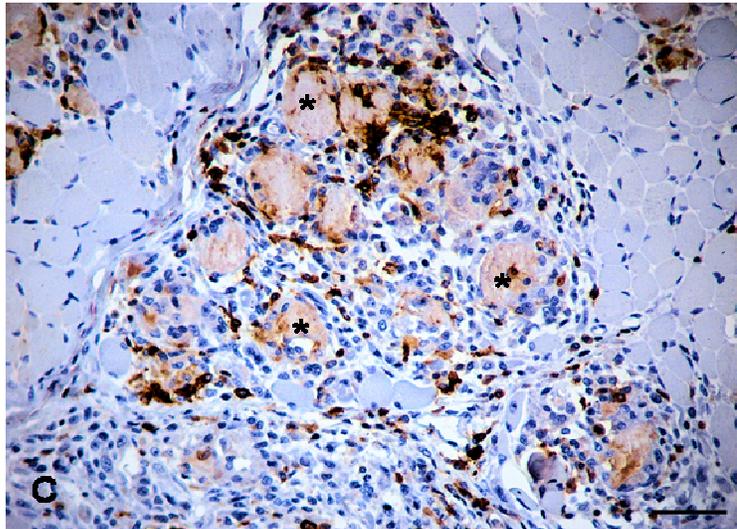
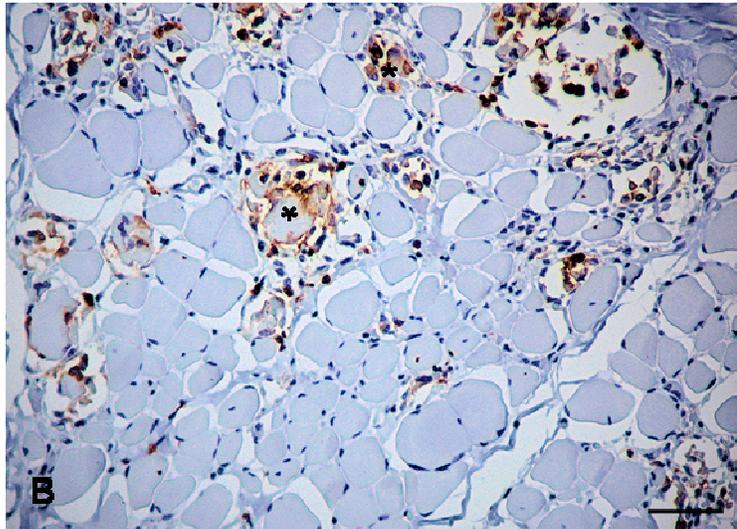
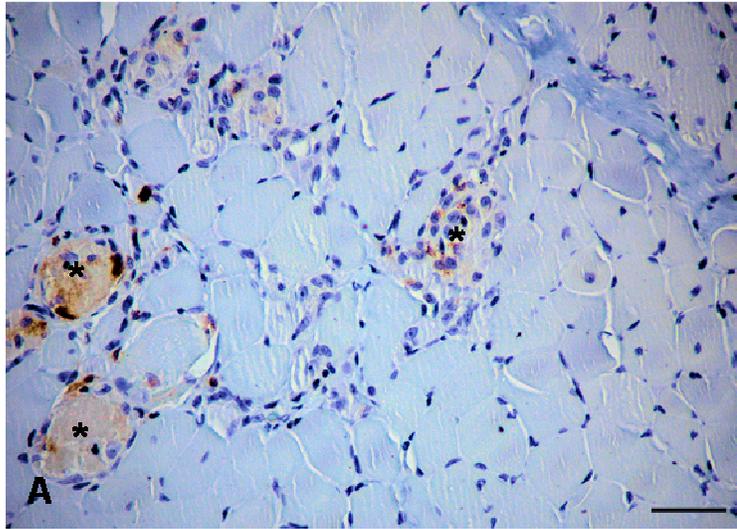


Figura 4. Reação de imunistoquímica para detecção do antígeno MHC II em músculos distróficos. Imunomarcção em grupos de células inflamatórias mononucleares em área de degeneração e necrose (*). **A.** Músculo bíceps femoral (escore 1). **B.** Músculo tríceps braquial (escore 2). **C.** Músculo masseter (escore 3). Método ABC. Barra = 50µm.

3.2.4. Expressão da Vimentina

A vimentina foi expressa nas paredes de vasos sangüíneos, gânglios nervosos e tecido conectivo dos músculos controle. Nos distróficos, a imunoexpressão ocorreu nas miofibras em degeneração, regeneração, áreas de necrose, fagócitos e em núcleos ao redor das miofibras (Figura 5).

A expressão da vimentina nos dois grupos de animais distróficos foi discreta (escore 1) em todos os músculos avaliados. Adicionalmente, verificou-se que o músculo sartório cranial dos animais do grupo II mostrou maior escore de imunoexpressão da vimentina, devido ao maior número de fagócitos (Tabela 11).

Tabela 11. Escores médios, erro padrão (EP), mínimos e máximos da imunoexpressão da vimentina nos músculos dos grupos distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.

Músculo	Grupo I (6 meses a 1 ano de idade)			Grupo II (acima de 1 ano de idade)		
	Média ± EP	Mínimo	Máximo	Média ± EP	Mínimo	Máximo
Masseter	1.0 ± 0.4	1.0	3.0	1.0 ± 0.4	1.0	3.0
Diafragma	1.0 ± 0.1	1.0	2.0	1.0 ± 0.3	1.0	3.0
Biceps braquial	1.0 ± 0.2	1.0	2.0	1.0 ± 0.1	1.0	2.0
Triceps braquial	1.0 ± 0.2	1.0	2.0	1.0 ± 0.3	1.0	3.0
Semitendinoso	1.0 ± 0.3	1.0	3.0	1.0 ± 0.2	1.0	2.0
Semimembranoso	1.0 ± 0.4	1.0	3.0	1.0 ± 0.4	1.0	3.0
Biceps femoral	1.0 ± 0.0	1.0	1.0	1.0 ± 0.1	1.0	2.0
Sartorio cranial	1.0 ± 0.2	1.0	2.0	1.5 ± 0.3	1.0	3.0

Escores de imunomarção: 0 = zero, 1 = discreta, 2 = moderada, 3 = acentuada.

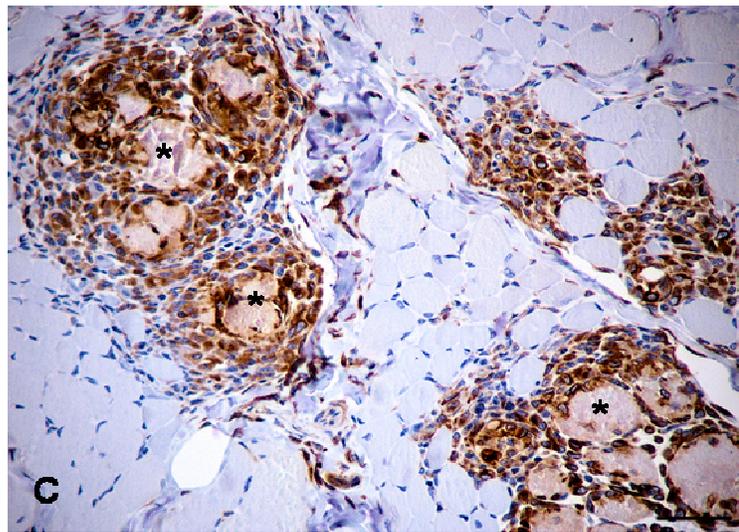
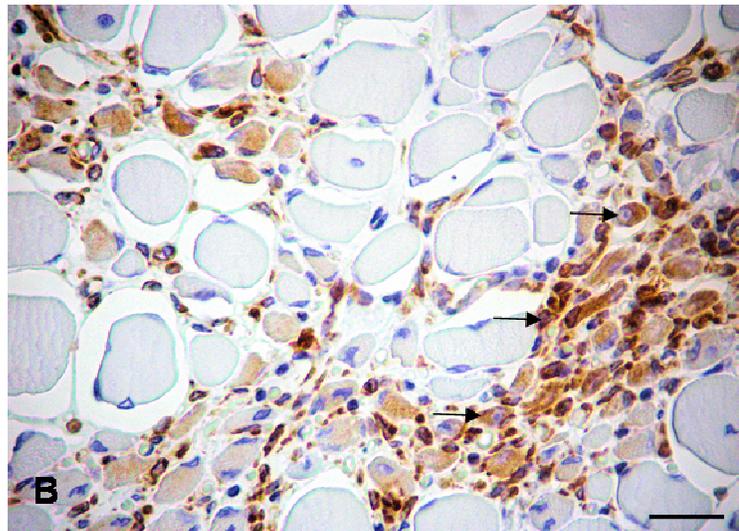
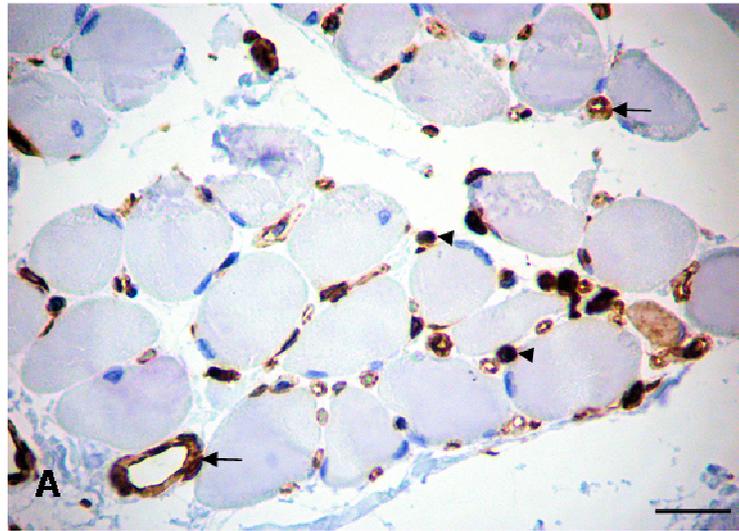


Figura 5. Reação de imunoistoquímica para detecção da vimentina em cortes histológicos de músculos. **A.** Músculo masseter. Marcações nas paredes de vasos sanguíneos (seta) e células satélites (cabeça da seta). **B.** Músculo semitendinoso. Marcações de miofibras em regeneração (seta). **C.** Músculo sartório cranial. Marcações em áreas de necrose (*) com macrófagos ao redor. Método ABC. Barra = 50 μm .

3.2.5. Expressão do VEGF

O estudo imunoistoquímico nos cortes de músculos controle mostrou que o VEGF expressou-se na parede de vasos sanguíneos. Adicionalmente, nos distróficos a imunoexpressão ocorreu na superfície de células inflamatórias mononucleares, isoladas ou agrupadas, áreas de necrose e em alguns núcleos que margeavam as miofibras, sugerindo sua expressão em CS (Figura 6). De acordo com a literatura, os receptores para o VEGF são expressos em CS e fibras em regeneração durante a isquemia.

De acordo com a Tabela 12, verifica-se que a expressão do VEGF em ambos os grupos distróficos foi discreta (escore 1) em todos os músculos avaliados, demonstrando que sua expressão foi fraca tanto em CS, fibras em regeneração e necrose.

Tabela 12. Escores médios, erro padrão (EP), mínimos e máximos da imunoexpressão do VEGF nos músculos dos grupos distróficos. Jaboticabal, SP, 2010.

Músculo	Grupo I (6 meses a 1 ano de idade)			Grupo II (acima de 1 ano de idade)		
	Média ± EP	Mínimo	Máximo	Média ± EP	Mínimo	Máximo
Masseter	1.0 ± 0.1	1.0	2.0	1.0 ± 0.3	0.0	2.0
Diafragma	1.0 ± 0.2	0.0	1.0	1.0 ± 0.2	0.0	1.0
Biceps braquial	1.0 ± 0.1	1.0	2.0	1.0 ± 0.2	1.0	2.0
Triceps braquial	1.0 ± 0.2	1.0	2.0	1.0 ± 0.0	1.0	1.0
Semitendinoso	1.0 ± 0.2	1.0	2.0	1.0 ± 0.3	0.0	2.0
Semimembranoso	1.0 ± 0.2	1.0	2.0	1.0 ± 0.2	1.0	2.0
Biceps femoral	1.0 ± 0.2	1.0	2.0	1.0 ± 0.2	1.0	2.0
Sartorio cranial	1.0 ± 0.2	0.0	2.0	1.0 ± 0.0	1.0	1.0

Escores de imunomarção: 0 = zero, 1 = discreta, 2 = moderada, 3 = acentuada.

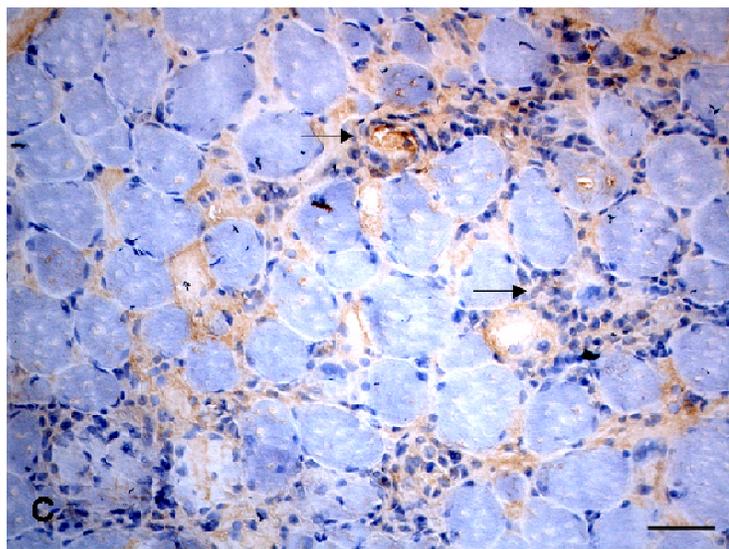
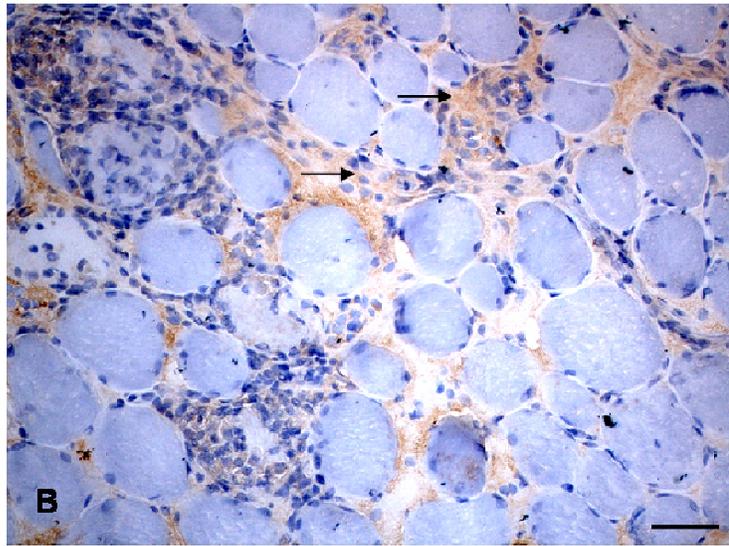
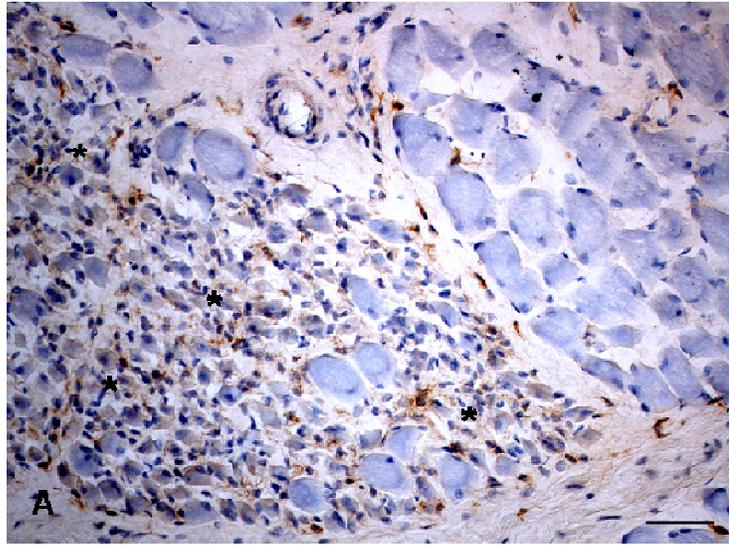


Figura 6. Imunoistoquímica para detecção de VEGF. **A.** Músculo masseter. Área de fibras em regeneração (*). **B, C.** Músculo Semimembranoso. Marcações em áreas de necrose e células inflamatórias mononucleares (seta). Método ABC. Barra = 50 µm.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foram identificadas pelas colorações de HE e TGM nove lesões em todos os oito músculos distróficos de cães de idades variáveis, sendo elas: hialinização, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, necrose, regeneração, fibras "ragged-red fibres" de aspecto granular vermelho-azulado em seu sarcoplasma, alterações no diâmetro das fibras, calcificação distrófica, infiltração gordurosa e fibrose intersticial. Estas lesões variavam em extensão e distribuição de acordo com o músculo e o animal. Quatro dessas lesões foram descritas em cães neonatos com exceção das três últimas (NGUYEN et al., 2002).

A imunexpressão do antígeno T-CD4⁺ (célula T auxiliar) na musculatura de cães afetados foi de uma a seis vezes maior que a de linfócitos T-CD8⁺ (célula T citotóxica), confirmando a participação dessas células dentre os principais constituintes celulares do processo inflamatório do músculo distrófico DMGR. Estes resultados concordam com os descritos por outros autores que descreveram predominância dos primeiros no músculo distrófico de camundongos mdx (SPENCER et al., 1997) e em humanos (McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990) e discordam de outros que apontam os linfócitos T-CD8⁺ como os maiores constituintes da população de células inflamatórias no músculo mdx (ARAHATA; ENGEL, 1988; EMSLIE-SMITH; ARAHATA; ENGEL, 1989; ENGEL; ARAHATA, 1986; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990).

Nos músculos distróficos de ambos os grupos avaliados as imunomarcações para o antígeno MHC II foram discretas (escore 1), ou seja, não houve aumento da expressão com a idade mesmo com o grande número de linfócitos T-CD4⁺. De acordo com relatos da literatura, células T-CD4⁺ produzem a IL-2 responsável pela ativação de linfócitos T-CD8⁺, fato que justifica sua identificação no músculo distrófico em tempos diferentes (GONZÁLEZ-QUINTIAL et al., 1996; SPENCER et al., 1997; UTZ; McFARLAND, 1994). Spencer et al. (1997) descreveram o aumento de células T auxiliares no músculo de camundongos mdx até oito semanas de idade, ressaltando a participação de T-CD4⁺ na ativação de T-CD8⁺ no local da injúria. Desta forma,

acreditamos que a função dos linfócitos T-CD4⁺ é de somente ativar linfócitos T-CD8⁺ e não a de atuar diretamente sobre o tecido lesionado de cães DMGR.

A imunoexpressão do antígeno MHC II ocorreu em grupos de células inflamatórias mononucleares, especialmente macrófagos, concentrados em áreas de degeneração e necrose confirmando sua participação na DMGR. Estes achados confirmam descrições anteriores que relatam sua imunoexpressão em células mononucleares e áreas de necrose (KARPATI; POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989). Segundo Wehling, Spencer e Tidball (2001) os macrófagos seriam o tipo celular primário envolvido na distrofinopatia e sua depleção no camundongo mdx seria responsável pela redução em 80% da necrose muscular nos estágios iniciais da doença. Apesar destes relatos, alguns autores confirmam também a expressão do antígeno MHC II na superfície de miofibras distróficas, fato este não encontrado nesse estudo (SPENCER; TIDBALL, 2001). A imunoexpressão do antígeno MHC II não variou com a idade, ao contrário do que outros autores afirmam para a DMD em humanos (McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1990). Entretanto não podemos excluir a possibilidade deste antígeno estar se expressando abaixo do limite de sensibilidade do procedimento imunoistoquímico utilizado.

O número de linfócitos T-CD8⁺ nos afetados foi significativamente maior em relação ao controle, demonstrando a participação destas células na DMGR bem como intensificação das marcações do antígeno MHC I com a idade. Este fato demonstra aumento da expressão das proteínas de superfície em miofibras lesionadas para que possa ocorrer a ação complementar de linfócitos T-CD8⁺. Desta forma, conclui-se que os linfócitos T-CD8⁺ estão entre as principais células inflamatórias responsáveis pelas lesões nos tecidos de cães DMGR.

A expressão do antígeno MHC I foi evidenciada na superfície de miofibras distróficas e em áreas de necrose, regeneração e inflamação. Estes dados corroboram com achados anteriores que descrevem a expressão deste antígeno na DMD em humanos (APPLEYARD et al., 1985; BEHRENS et al., 1998; EMSLIE-SMITH; ARAHATA; ENGEL, 1989; KARPATI; POULIOT; CARPENTER, 1988; McDOUALL; DUNN; DUBOWITZ, 1989). Estas características sugerem a participação das células T

na patogenia da DMD e sua ativação em resposta a um antígeno específico. Embora a fonte de ativação do antígeno seja ainda desconhecida, é possível que ela decorra de danos oriundos do processo de contração no músculo distrófico (SPENCER; TIDBALL, 2001).

A imunoexpressão do antígeno CD3 não foi proporcional à quantidade de linfócitos T-CD4⁺ ou T-CD8⁺, ao contrário do que descreveram outros autores que verificaram que anticorpos policlonais anti-CD3 humano apresentaram reatividade cruzada para linfócitos T-CD3⁺ caninos (FERRER et al., 1992). Entretanto, estes resultados, podem ser explicados pela impermeabilidade de linfócitos T-CD3⁺ que impedem a passagem do cromógeno pela membrana celular (COBBOLD; METCALFE, 1994).

A imunoexpressão da vimentina foi discreta (escore 1) independente da idade dos animais distróficos e ocorreu nas áreas de degeneração, necrose, regeneração e em alguns núcleos periféricos das miofibras, denominados CS ativas (VATER; CULLEN; HARRIS, 1994). Esses achados corroboram com os descritos em casos humanos de DMD (GALLANTI et al., 1992; VATER; CULLEN; HARRIS, 1994).

A fraca marcação da vimentina neste estudo poderia estar relacionada aos repetidos ciclos de degeneração e regeneração proporcionados pela doença com diminuição no número de CS que ocorre em estados mórbidos e no envelhecimento. Nestas condições, a regeneração muscular fica prejudicada, as CS são escassas e sua marcação pela vimentina é desprezível (JEJURIKAR; KUZON, 2003).

No músculo sartório cranial dos animais do grupo II foi encontrado maior escore para a vimentina (1,5) em consequência do aumento do grau de lesão encontrado nestes (3,0). Sabe-se que em cães DMGR este músculo sofre hipertrofia até os 10 meses de idade e posteriormente atrofia progressiva responsável pelo agravamento das lesões musculares (KORNEGAY et al., 1988).

A análise dos resultados morfológicos não permitiu estabelecer relação entre regeneração e a necrose, apesar de ambas estarem presentes em todas as idades. A regeneração de miofibras foi fraca enquanto que a intensidade da necrose foi variável.

Nossos dados discordam dos descritos por Valentine et al. (1990) que afirmam que ambas são marcantes em animais jovens.

De modo semelhante ao observado para a vimentina, a expressão do VEGF foi discreta nos dois grupos de animais distróficos (escore 1). Algumas hipóteses que se associam a este resultado podem ser discutidas. A primeira é de que o anticorpo utilizado para a marcação do antígeno VEGF não é específico para a espécie canina. A segunda seria de que, em tecidos normais, o VEGF-A se expressa em níveis elevados especialmente nos pulmões, rins, coração e glândulas adrenais, não sendo seletivo para o músculo esquelético (NEUFELD et al., 1999; POLTORAK et al., 1997). A terceira hipótese seria que a expressão do VEGF-A é induzida em condições de hipóxia ou hipoglicemia celular. Não há relatos na literatura consultada de sua expressão em tecido muscular de distróficos (SAITO et al., 2009). A quarta e última hipótese poderia ser justificada pelo número reduzido de CS e de fibras em regeneração, uma vez que o VEGF se expressa em condição oposta a esta (GERMANI et al., 2003).

Considerando que o VEGF desempenha papel chave na angiogênese patológica ao estimular a proliferação, migração e sobrevivência das CEs (KLAGSBRUN; D'AMORE, 1996; MATSUMOTO; CLAEISSON-WELSH, 2001), sua fraca imunoexpressão prejudicaria a revascularização de tecidos necróticos. Neste caso, a contagem de neovasos seria de grande contribuição no estudo da patogenia da DMGR ao permitir a avaliação da capacidade de revascularização do tecido distrófico canino.

Deve-se considerar que o dano mecânico da miofibra proporcionado pela ausência da distrofina desencadeia uma seqüência de eventos inflamatórios e degenerativos que contam também com a participação de outras células inflamatórias como, por exemplo, os mastócitos. No músculo distrófico, os mastócitos estão entre os primeiros a serem ativados a injúria muscular, degranulando e liberando citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o Fator de necrose tumoral α (TNF α) (COLLINS; GROUNDS, 2001; GORDON; GALLI, 1990). O TNF α é uma potente citocina pró-inflamatória que atrai leucócitos e induz a inflamação com o aumento da atividade de outras citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER; CERAMI, 1988). Sendo assim, o uso de um anticorpo anti-TNF α poderia ser crucial no bloqueio da resposta inflamatória em cães DMGR.

Atualmente, existem pesquisas em camundongos jovens mdx com o uso de um anticorpo (Remicade®) que bloqueia a atividade do TNF α possuindo forte efeito protetor das miofibras distróficas e impedindo a fase inicial aguda da necrose (GROUNDS; TORRISI, 2004).

Assim, pelos resultados encontrados conclui-se que esta e outras pesquisas realizadas até o momento ainda não foram suficientes para explicar a fisiopatogenia das lesões musculares e dos danos clínicos exibidos por pacientes distróficos humanos ou animais.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

1. A quantidade de células de fenótipo T-CD4⁺ (célula T auxiliar) detectada na musculatura de cães distróficos DMGR é de uma a seis vezes maior que o número de linfócitos T-CD8⁺ (célula T citotóxica).
2. O número de linfócitos T-CD3⁺, T-CD4⁺ e T-CD8⁺ na musculatura não varia com a idade dos afetados.
3. A imunomarcagem do antígeno MHC I no músculo distrófico DMGR aumenta com a idade e é válida para o diagnóstico da doença.
4. A expressão do antígeno MHC II no músculo distrófico DMGR ocorre em grupos de células inflamatórias mononucleares, especialmente macrófagos, concentradas em áreas de degeneração e necrose.
5. A imunoexpressão da vimentina ocorre em áreas de regeneração, degeneração e necrose e é proporcional à intensidade da resposta inflamatória e do processo degenerativo e independente da idade dos animais.
6. A expressão do VEGF foi discreta independente da idade dos animais afetados.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.R. Chronic Inflammation and Wound Healing. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. Saint Louis: Mosby Elsevier, 2007. Cap. 4, p. 153-191.

APPLEYARD, S.T.; DUNN, J.J.; DUBOWITZ, V.; ROSE, M.L. Increased expression of the HLA abc class I antigens by muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, inflammatory myopathy and other neuromuscular disorders. **The Lancet**, v. 16; p. 361-363, 1985.

ARAHATA, K.; ENGEL, A.G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV. Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. **Annals of Neurology**, v. 23, n. 2, p. 168-173, 1988.

ASAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; MASUDA, H.; KALKA, C.; CHEN, D.; IWAGURO, H.; INAI, Y.; SILVER, M.; ISNER, J.M. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 14, p. 3964-3972, 1999.

BEHRENS, L.; KERSCHENSTEINER, M.; MISGELD, T.; GOEBELS, N.; WEKERLE, H.; HOHLFELD, R. Human Muscle Cells Express a Functional Costimulatory Molecule Distinct from B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) In Vitro and in Inflammatory Lesions. **The Journal of Immunology**, v. 161, n.11, p. 5943-5951, 1998.

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

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 505–518, 1988.

BISQUERRA, R.F.; SARRIERA, J.C.; MARTÍNEZ, F. In: BISQUERRA, R.F.; SARRIERA, J.C.; MARTÍNEZ, F. **Introdução à Estatística – enfoque informático com o pacote estatístico SPSS**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 255

BRAUND, K.G.; MCGUIRE, J.A.; LINCOLN, C.E. Observations on Normal Skeletal Muscle of Mature Dogs: a cytochemical, histochemical, and morphometric study. **Veterinary Pathology**, v.19, p.577-595, 1982.

BROOKE, M.H.; FENICHEL, G.M.; GRIGGS, R.C.; MENDELL, J.R.; MOXLEY, R.D.; MILLER, J.P.; KAISER, K.K.; FLORENCE, J.M.; PANDYA, S.; SIGNORE, L. Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy. Interesting results in a trial of prednisone. **Archives of Neurology**, v. 44, n.8, p. 812–817, 1987.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 4, p. 1189-1192, 1984.

COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, v. 43, n. 3, p. 137-54, 1994.

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, n. 4, p. 165-172, 2003.

COLLINS, R.A.; GROUNDS, M.D. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNFalpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha (-/-) mice. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 989– 1001, 2001.

COOPER, B.J.; WINAND, N.J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B.A.; HOFFMAN, E.P.; KUNKEL, L.M.; SCOTT, M.O.; FISCHBECK, K.H.; KORNEGAY, J.N.; AVERY, R.J.; WILLIAMS, J.R.; SCHMICKEL, R.D.; SYLVESTER, J.E. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, v. 334, n. 6178, p. 154-156, 1988.

DRACHMAN, D.B.; TOYKA, K.V.; MYER, E. Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. **The Lancet**, v. 14, n. 2, p. 1409–1412, 1974.

EMSLIE-SMITH, A.M.; ARAHATA, K.; ENGEL, A.G. Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. **Human Pathology**, v. 20, n. 3, p. 224-231, 1989.

ENGEL, A.G.; ARAHATA, K. Mononuclear cells in myopathies: Quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. **Human Pathology**, v. 17, n. 7, p. 704–721, 1986.

ENGEL, W.K.; CUNNINGHAM, G.G. Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. **Neurology**, v. 13, p. 919-923, 1963.

FENICHEL, G.M.; FLORENCE, J.M.; PESTRONK, A.; MENDELL, J.R.; MOXLEY, R.C.; GRIGGS, R.C.; BROOKE, M.H.; MILLER, J.P.; ROBISON, J.; KING, W; SIGNORE, L.; PANDYA, S.; SCHIERBECKER, J.; WILSON, B. Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 41, p. 1874–1877, 1991.

FERRER, L.; FONDEVILA, D.; RABANAL, R.; RAMIS, A. Detection of T Lymphocytes in Canine Tissue Embedded in Paraffin Wax by means of Antibody to CD3 Antigen. **Journal of Comparative Pathology**, v. 106, p. 311-314, 1992.

FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; OSBORN, M.; WEBER, K. Different intermediate-size filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 10, p. 5034-5038, 1978.

GALLANTI, A.; PRELLE, A.; MOGGIO, M.; CISCATO, P.; CHECCARELLI, N.; SCIACCO, M.; COMINI, A.; SCARLATO, G. Desmin and Vimentin as markers of regeneration in muscle diseases. **Acta Neurophatologica**, v. 85, p. 88–92, 1992.

GERMANI, A.; DI CARLO, A.; MANGONI, A.; STRAINO, S.; GIACINTI, C.; TURRINI, P.; BIGLIOLI, P.; CAPOGROSSI, M.C. Vascular Endothelial Growth Factor Modulates Skeletal Myoblast Function. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 4, p. 1417-1428, 2003.

GONZÁLEZ-QUINTIAL, R.; BACCALÀ, R.; POPE, R.M.; THEOFILOPOULOS, A.N. Identification of clonally expanded T cells in rheumatoid arthritis using a sequence enrichment nuclease assay. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 5, p. 1335–1343, 1996.

GORDON, J.R.; GALLI, S.J.. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 274– 276, 1990.

GOWERS, W.R. Clinical lectures on pseudohypertrophic muscular paralysis. **The Lancet**, v. 2, p. 1-2, 1879.

GRIGGS, R.C.; MOXLEY, R.C.; MENDELL, J.R.; FENICHEL, G.M.; BROOKE, M.H.; PESTRONK, A.; MILLER, J.P. Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group. **Archives of Neurology**, v. 48, n. 4, p. 383–388, 1991.

GROUNDS, M.D.; TORRISI, J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 6, p. 676– 682, 2004.

HALLORAN, P.F.; WADGYMAR, A.; AUTENRIED, P. The regulation of expression of major histocompatibility complex products. **Transplantation**, v. 41, n. 4, p. 413-420, 1986.

HARRIS, H.W.; GILL, T.J. Expression of Class I Transplantation Antigens. **Transplantation**, v. 42, n. 2, p. 109-117, 1986.

HOFFMAN, E.P.; BROWN, R.H.JR.; KUNKEL, L.M. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v. 51, n. 6, p. 919–928, 1987.

HSU, S.M.; RAINER, L.; FANGER, H.A. A comparative study of the peroxidaseantiperoxidase method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 75, p. 734-738, 1981.

JEJURIKAR, S.S.; KUZON Jr., W.M. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 8, n. 6, p. 573-578, 2003.

JIN, K.L.; MAO, X.O.; GREENBERG, D.A. Vascular endothelial growth factor: Direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10242–10247, 2000.

KALKA, C.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; GORDON, R.; TEPPER, O.; GRAVEREAUX, E.; PIECZEK, A.; IWAGURO, H.; HAYASHI, S.I.; ISNER, J.M.; ASAHARA, T. Vascular Endothelial Growth Factor¹⁶⁵ Gene Transfer Augments Circulating Endothelial Progenitor Cells in Human Subjects. **Circulation Research**, v. 86, p. 1198-1202, 2000.

KARPATI G.; POULIOT Y.; CARPENTER S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. **Annals of Neurology**, v. 23, p. 64-72, 1988.

KISSEL, J.T.; BURROW, K.L.; RAMMOHAN, K.W.; J.R. MENDELL. Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone-treated and untreated Duchenne muscular dystrophy. CIDD Study Group. **Neurology**, v. 41, n. 5, p. 667–672, 1991.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P.A. Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 7, n. 3, p. 259-270, 1996.

KOENIG, M.; HOFFMAN, E.P.; BERTELSON, C.J.; MONACO, A.P.; FEENER, C.; KUNKEL, L.M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell**, v. 50, n. 3, p. 509–517, 1987.

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, n. 10, p. 1056-1064, 1988.

LAZARIDES, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of space. **Nature**, v. 283, p. 249-56, 1980.

MARTZ, E.; HEAGY, W.; GROMSOWSKI, S.H. The mechanism of CTL mediated killing: monoclonal antibody analysis of the roles of killer and target-cell membrane proteins. **Immunological reviews**, v. 72, p. 73-96, 1983.

MATSUMOTO, T.; CLAESSION-WELSH, L. VEGF receptor signal transduction. **Science's STKE: signal transduction Knowledge environment**, v. 112, p. 1–17, 2001.

McDOUALL, R.M.; DUNN, M.J.; DUBOWITZ, V. Expression of class I and class II MHC antigens in neuromuscular diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 89, p. 213-26, 1989.

McDOUALL, R.M.; DUNN, M.J.; DUBOWITZ, V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 99, p. 199-217, 1990.

McMICHAEL, A.J. HLA restriction of human cytotoxic T-cells. **Springer seminars in immunopathology**, v. 3, n. 1, p. 3-22, 1980.

MIYAZATO, L.G. Distrofia Muscular no Golden Retriever, 2005. 82p. **Dissertação** (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MONACO, A.P.; KUNKEL, L.M. Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. **Advances in Human Genetics**, v. 17, p. 61–98, 1988.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 9-22, 1999.

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

NICO, B.; CORSI, P.; VACCA, A.; RONCALI, L.; RIBATTI, D. Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in mdx mouse brain. **Brain Research**, v. 953, n. 1-2, p. 12-6, 2002.

PAS, J.V.D.; HENGSTMAN, G.J.D.; LAAK, H.J.T.; BORM, G.F.; ENGELEN, B.G.M.V. Diagnostic value of MHC class I staining in idiopathic inflammatory myopathies. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.75, p. 136-139, 2004.

PLOEGH, H.L.; ORR, H.T.; STROMINGER, J.L. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. **Cell**, v. 24, n. 2, p. 287-299, 1981.

POLTORAK, Z.; COHEN, T.; SIVAN, R.; KANDELIS, Y.; SPIRA, G.; VLODAVSKY, I.; KESHET, E.; NEUFELD, G. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 14, v. 272, n. 11, p. 7151-7158, 1997.

PONDER, B.A.; WILKINSON, M.M.; WOOD, M.; WESTWOOD, J.H. Immunohistochemical demonstration of H2 antigens in mouse tissue sections. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 911-919, 1983.

SAITO, T.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMURA, T.; FUJIMURA, H.; SHINNO, S. Serum levels of vascular endothelial growth factor elevated in patients with muscular dystrophy. **Brain & Development**, v. 31, n. 8, p. 612-617, 2009.

SEKO, Y.; TAKAHASHI, N.; TOBE, K.; UEKI, K.; KADOWAKI, T.; YAZAKI, Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) activates Raf-1, mitogen-activated protein (MAP) kinases, and S6 kinase (p90^{rsk}) in cultured rat cardiac myocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 175, n. 3, p. 239–246, 1998.

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

SPENCER, M.J.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K.; TIDBALL, J.G. Helper (CD4+) and Cytotoxic (CD8+) T Cells Promote the Pathology of Dystrophin-Deficient Muscle. **Clinical Immunology**, v. 98, n. 2, p. 235–243, 2001.

SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? **Neuromuscular Disorders**, v. 11, n. 6, p. 556-564, 2001.

SPENCER, M.J.; WALSH, C.M.; DORSHKIND, K.A.; RODRIGUEZ, E.M.; TIDBALL, J. G. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 11, p. 2745–2751, 1997.

STEINERT, P.M.; JONES, J.C.R; GOLDMAN, R.D. Intermediate filaments. **The Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 1, p. 22s-27s, 1984.

TRAUB, P. **Intermediate Filaments. A Review**. Berlin: Springer-Verlag, 1985. 266 p.

UTZ, U.; McFARLAND, H.F. The role of T cells in multiple sclerosis: implications for therapies targeting the T cell receptor. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 53, n. 4, p. 351–358, 1994.

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, n. 1, p. 1-23, 1990.

VATER, R.; CULLEN, M.J.; HARRIS, J.B. The expression of vimentin in satellite cells of regenerating skeletal muscle *in vivo*. **The Histochemical Journal**, v. 26, n. 12, p. 916-928, 1994.

VATER, R.; CULLEN, M.J.; HARRIS, J.B. The fate of desmin and titin during the degeneration and regeneration of the soleus muscle of the rat. **Acta Neuropathologica**, v. 84, n. 3, p. 278-288, 1992.

VATER, R.; CULLEN, M.J.; NICHOLSON, L.V.; HARRIS, J.B. The fate of dystrophin during the degeneration and regeneration of the soleus muscle of the rat. **Acta Neuropathologica**, v. 83, n. 2, p. 140-148, 1992.

WAGATSUMA, A.; TAMAKI, H.; OGITA, F. Sequential expression of vascular endothelial growth factor, Flt-1, and KDR/Flk-1 in regenerating mouse skeletal muscle. **Physiological Research**, v. 55, p. 633–640, 2006.

WEHLING, M.; SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. **Journal of Cell Biology**, v. 155, n. 1, p. 123–131, 2001.

APÊNDICE

Apêndice A. Idade e classificação dos animais de acordo com o grupo. Jaboticabal, SP, 2010.

Animal	Grupo	Classificação	Idade
1	GII	distrófico	51 meses
2	GII	distrófico	21 meses
3	GII	distrófico	20 meses
4	GII	distrófico	17 meses
5	GII	distrófico	15 meses
6	GII	distrófico	15 meses
7	GII	distrófico	13 meses
8	GI	distrófico	12 meses
9	GI	distrófico	11 meses
10	GI	distrófico	11 meses
11	GI	distrófico	10 meses
12	GI	distrófico	9 meses
13	GI	distrófico	8 meses
14	GI	distrófico	8 meses
15	GI	distrófico	7 meses
16	GI	distrófico	5 meses
17	GI	distrófico	2 meses
18	GIV	controle	84 meses
19	GIV	controle	18 meses
20	GIV	controle	15 meses
21	GIII	controle	10 meses
22	GIII	controle	6 meses
23	GIII	controle	3 meses
24	GIII	controle	2 meses
25	GIII	controle	2 meses

GI – grupo I, GII – grupo II, GIII – grupo III, GIV – grupo IV.