MARINA PANDOLPHI BROLIO

Acompanhamento clínico e morfológico da distrofia muscular do cão Golden Retriever (GRMD)

São Paulo
2008

MARINA PANDOLPHI BROLIO

Acompanhamento clínico e morfológico da distrofia muscular do cão Golden Retriever (GRMD)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2008

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
6/8/08

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2024
FMVZ

Brolio, Marina Pandolphi
Acompanhamento clínico e morfológico da distrofia muscular do cão Golden Retriever (GRMD) / Marina Pandolphi Brolio. – São Paulo : M. P. Brolio, 2008.
108 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2008.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. GRMD. 2. Distrofia muscular. 3. Cão. 4. Distrofina. 5. Golden Retriever. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Acompanhamento clínico e morfológico da distrofia muscular do cão Golden Retriever", protocolado sob o nº 1158/2007, utilizando 12 (doze) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio (Pós-Doutorando do VCI), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

We certify that the Research "Clinical and morphologic accompaniment of the muscular dystrophy of Gold Retriever dog", protocol number 1158/2007, utilizing (twelve) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/2007.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

DEDICATÓRIA

Mestre

É aquele que caminha com o tempo,
propondo paz, fazendo comunhão,
despertando sabedoria.

Mestre é aquele que estende a mão,
inicia o diálogo e encaminha
para a aventura da vida.

Não é o que ensina fórmulas, regras,
raciocínios, mas o que questiona
e desperta para a realidade.

Não é aquele que dá de seu saber
mas aquele que faz germinar
o saber do discípulo.

Mestre é você, meu querido professor...
Meu amigo CAIU,
que me compreende, me estimula,
briga comigo, me puxa a orelha,
me comunica e me enriquece com
sua presença, seu saber e sua ternura.

Eu serei sempre sua discípula
na escola da vida.

Muito Obrigada por tudo ...

(Adaptado de N.Maccari)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Mãe

Mãe, amor sincero sem exagero...
Maior que o teu amor, só o amor de Deus...
É uma árvore que fecunda, que germina um novo ser.
Teus filhos, mais que frutos, são parte de você...

És capaz de doar a própria vida para salvá-los.
E muitos não te valorizam...
Quando crescem, de ti esquecem.
São poucos os que reconhecem...

Mas, Deus nunca lhe esquecerá,
E abençoará tudo que fizerdes aos seus...
Peço ao Pai Criador que abençoe você.

Obrigada é muito pouco, presente não é tudo.
Mas, o reconhecimento e gratidão são pra valer...
Meus sinceros agradecimentos por este momento...

Sem seu amor e apoio incondicionais eu não chegaria até aqui...

AMO você e te admiro muito!

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Angélica Miglino por ter-me aceitado em seu Departamento, abrindo as portas para que eu pudesse realizar o desejo de cursar uma pós-graduação numa instituição tão conceituada como a nossa querida FMVZ-USP...

Às professoras Maria Angélica Miglino e Mayana Zatz pela oportunidade única de fazer parte de um projeto de pesquisa maravilhoso, que é um aprendizado de vida. Obrigada, parabéns a vocês, e que tenham força e estímulo para continuar sempre, o Canil GRMD-BR não pode parar, nunca!

À Cristiane Valverde Wenscelau, um anjo que Deus colocou em minha vida, você é especial e importante demais para mim, uma pessoa de caráter inquestionável, amiga para todas e quaisquer situações, e uma profissional que admiro muito...

À Daniele dos Santos Martins, além de excelente profissional e colega de trabalho, amiga para vida inteira; sempre disposta a me ajudar, fosse me ensinando a ler lâminas de citologia vaginal, fosse nas "crises" de canil, fosse para me abrigar em sua casa por "um fim de semana..."

À Adriana C. Morini, que desde os tempos da graduação sempre me impressionou com sua força de vontade, garra e sabedoria, sempre me escutando e me ensinando algo, até herdei algumas funções suas no canil... Você é ímpar, além de "parsa", você é "divertida"!

Aos queridos André Franciolli, Carlos Alberto Sarmento João C. Morini e Phelipe Favaron: encontrei amigos verdadeiros e muito importantes para mim onde não esperava...

À Thaís Peixoto Gaiad, pela paciência, companheirismo e profissionalismo; é muito bom conviver e trabalhar com você! Sem seus conhecimentos esse trabalho não estaria completo...

Aos amigos André Gatti, Guilherme Buzon,, Matheus Tajra e Leandro Fadel: muito bom conviver e aprender com vocês, sempre dispostos a ouvirem meus questionamentos, discuti-los, e dividir seu conhecimento.

Às queridas Karlinha, Angélica e Marina; minhas "colegas de plantão" e amigas para a vida toda, vocês são especiais...

A todos os pós-graduandos que fizeram e fazem parte do grupo do Canil GRMD-BR, impossível escrever o nome de todos...

A todos os alunos da graduação – nossos "ICs" - que fizeram ou fazem parte do nosso grupo; em especial aos meus queridos "filhos e afilhados" Bruno, Rafael, Caio e Carolina! Foi muito bom aprender com vocês!

Ao querido Augusto, pessoa especial e essencial para o andamento do Canil...

Aos queridos Jackie e Maicon, amigos solícitos e dispostos a ajudar a todos.

À Professora Maria Helena Larsson, por abraçar nosso projeto, disponibilizar os serviços de Cardiologia e Laboratório Clínico aos nossos cães e sempre nos ajudar com seu conhecimento.

Ao querido Ronaldo Jun Yamato, muito obrigada pela paciência e ensinamentos no ramo da cardiologia veterinária, você é parte essencial deste trabalho... Muito obrigada pela amizade, pelos momentos, angústias, fins de semana e pensamentos compartilhados...

À Paulinha, por todos os eletros rodados e laudados, por todas as tardes divididas, pela disponibilidade em ajudar sempre!

À querida Cleide, sempre disposta a me ajudar e me ouvir; fosse me ensinando a fazer um esfregaço sanguíneo corretamente, ou conseguindo um resultado mais rápido, emprestando um tubo de última hora, ou ouvindo minhas angústias quando um exame levava a um prognóstico ruim, sempre me trazendo uma alternativa boa para os obstáculos da minha pesquisa.

À professora Camila I. Vannucchi, sempre disposta a ajudar à equipe do Canil-GRMD, nunca negou seu conhecimento e seu tempo para nossa causa.

Aos professores e funcionários do Setor de Radiologia, aqui representados pela querida Silvana, sempre com tempo e conhecimento disponíveis para nossos cães.

A todos os enfermeiros do Hovet, aqui representados pelo Carlitos e Giba, que nunca me negaram um pedido, sempre alegres e com uma solução para os problemas que eu lhes levava!

À Denise Simões, médica veterinária exemplar, sempre disposta a me ouvir e me orientar, nunca fechou as portas para os cães...

A todos os funcionários da biblioteca, em especial às queridas Elza e Helena; sempre pacientes, atenciosas e compreensivas comigo..

Aos meus amigos Marcus Vinícius e Marco Antonio, vocês não têm consciência da real importância que têm em minha vida, o quanto, em pensamento, me ajudaram e me estimularam a executar e concluir este trabalho. Seu carinho e de suas famílias, que também são minhas, são tudo para mim! Pois nossas vidas pessoal e profissional caminham lado a lado e uma interfere diretamente na outra. Obrigada por tudo!

À minha querida amiga Vivi, obrigada por dividir momentos importantes comigo, até plantões, por exemplo! Sofremos, choramos, rimos e comemoramos muito juntas, é bom saber que posso contar com você, que também me emprestou sua família e amigos e hoje sei que tenho vários tios, tias, vós e primos do coração... Amooo muito mais que chocolate branco!

Aos meus avós, Iracema e Mariano, que mesmo longe estão comigo em pensamentos e orações, vocês são um exemplo para mim. Amo muito vocês!

Ao meu queridos irmão Murilo e meu pai Nino, que mesmo longe sempre me ajudam, me incentivam e estimulam a ir a além, e também estão indiretamente super ligados ao Canil, cuidando da querida Brenda para mim.

Às minhas amigas e colegas de "República", Carolina e Fernanda. Vocês são muito importantes para mim.

À minha tia Lucilia Maria Brolio Gonçalves, pela correção gramatical do presente trabalho, e principalmente, obrigada por me estimular a ler desde minha infância, me ajudando a descobrir o fascínio pela leitura e conhecimento.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos os cães do Canil, cada um que passou por lá me ensinou lições que levarei para o resto de minha vida, um olhar de vocês vale mais do que mil palavras, seus ensinamentos não são encontrados nem nos melhores livros científicos, suas lições estão presentes na alma, nas atitudes e pensamentos de cada pessoa que teve a honra de ter contato com vocês e a humildade de aprender e abrir o coração; e principalmente, enxergar além de babas, papinhas, pêlos e baias a serem lavadas. "Au, au, au!" (Muito obrigada)!

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BROLIO, Marina Pandolphi

Título: Acompanhamento clínico e morfológico da distrofia muscular do cão Golden Retriever (GRMD)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 01/03/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. CARLOS EDI AMBRÓSIO Instituição: FMVZ/USP

Assinatura: _____ Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. Marta M. C. Lippi Instituição: UNID/Campinas

Assinatura: _____ Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. MARCELO BERTOLINI Instituição: UDESC/LAGES, SC

Assinatura: _____ Julgamento: APROVADA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL = albumina.

AD = átrio direito.

AE = átrio esquerdo.

AE/Ao = relação entre a medida da raiz da aorta e o átrio esquerdo.

ALT = alanina aminotransferase.

Ao = raiz da aorta.

BL = bilirrubina.

C.H.C.M. = concentração de hemoglobina corpuscular média.

CK = creatina quinase.

CXMD = distrofia muscular canina ligada ao X.

cm = centímetros.

dL = decilitro.

dES = distância entre o ponto E da válvula mitral e o septo interventricular.

DHL = desidrogenase lática.

DMD = Distrofia Muscular de Duchenne.

DVEd = diâmetro interno da cavidade do ventrículo esquerdo em diástole.

DVEs = diâmetro interno da cavidade do ventrículo esquerdo em sístole.

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético.

ECO = exame ecocardiográfico.

ECG = exame eletrocardiográfico.

EPSS = *E point to septal separation*.

FA = fosfatase alcalina.

FC = freqüência cardíaca.

FE = fração de ejeção (%)

FS = fração de encurtamento (%)

GRMD = Golden Retriever Muscular Dystrophy.

H.C.M. = hemoglobina corpuscular média.

He = hemácias.

Hb = hemoglobina.

Ht = hematócrito.

Mhz = megahertz.

mL = mililitros.

mg = miligramas.

PPVE = engrossamento sistólico da parede do ventrículo esquerdo.

PSIV = engrossamento sistólico do septo interventricular.

PT = proteína total

PVE = parede do ventrículo esquerdo.

PVEd = espessura da parede do ventrículo esquerdo na diástole.

PVEs = espessura da parede do ventrículo esquerdo na sístole.

RX = exame radiográfico.

SIV = septo interventricular.

SIVd = espessura do septo interventricular na diástole.

SIVs = espessura do septo interventricular na sístole.

SIVd/PVEd = relação entre a espessura do septo interventricular e a parede do ventrículo esquerdo na diástole.

SIVs/PVEs = relação entre a espessura do septo interventricular e a parede do ventrículo na sístole.

SPTZ = espermatozóides.

V.C.M. = volume corpuscular médio.

VD = ventrículo direito.

VE = ventrículo esquerdo.

VOLd = volume na diástole.

VOLs = volume na sístole.

Vej = volume de ejeção.

U/L = unidades por litro.

% = porcentagem.

μ^3 = micra cúbica.

μμg = picograma.

RESUMO

BROLIO, M. P. **Acompanhamento clínico e morfológico da distrofia muscular do cão Golden Retriever (GRMD).** [Monitoring clinical and morphological of muscular dystrophy of the Golden Retriever dogs (GRMD)]. 2008.108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O cão GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) é um excelente modelo de estudo sobre a ação da terapia celular para aplicação a DMD – Distrofia Muscular de Duchenne, que ocorre em humanos, devido à similaridade clínica entre ambos. Estas doenças têm em comum a herança recessiva ligada ao cromossomo X; e são causadas pela ausência de uma proteína chamada distrofina, a qual está presente no sarcolema das fibras musculares. O ponto da estrutura da mutação no gene da distrofina é responsável pelo fenótipo GRMD; e é possível encontrarmos indivíduos com características clínicas bem diferentes uns dos outros. Atualmente não existe um tratamento específico para a distrofia muscular de Duchenne; e os estudos sobre o desenvolvimento clínico e morfológico da distrofia muscular visam, através de avaliações constantes, estabelecer uma padronização fenotípica para estes animais com vistas a controlar resultados pré-clínicos adequadamente e assegurar-lhes uma boa qualidade de vida; para que tenham condições de ser submetidos aos protocolos de terapia celular em desenvolvimento no canil GRMD Brasil; e, com isto, conhecer claramente a ação efetiva da terapia celular versus desenvolvimento morfológico desta doença degenerativa progressiva dos cães. Realizou-se o acompanhamento clínico e morfológico de 12 cães GRMD, 06 fêmeas e 06 machos, do nascimento aos 12 meses de idade. Avaliando-se o aparelho locomotor, notou-se que entre a primeira (cinco meses de idade) e última avaliação (12 meses), houve uma piora com evolução significativa na assimetria postural, aumento do ângulo do tarso e carpo, adução dos membros, dissociação da cintura pélvica, além de alterações na mobilidade ativa dos joelhos durante a atividade de marcha. A avaliação andrológica dos cães distróficos indicou maiores taxas de anormalidade espermática (defeitos maiores e menores) comparada à de cães normais aos 12 meses de idade; ao passo que as fêmeas manifestaram maturidade sexual aos 09 meses. O acompanhamento hematológico mensal mostrou valores próximos do ideal para cães saudáveis, sendo que os exames realizados com os animais entre seis e doze meses de idade foram aqueles que indicaram maiores alterações em relação aos valores de referência para a espécie. Concentrações médias para hemácias, hemoglobina e hematócrito foram menores que a média para esta faixa etária. Quanto às avaliações bioquímicas séricas, CK é uma ferramenta importante para diagnóstico e acompanhamento da distrofia muscular em cães, devido às suas oscilações e aumentos indiscutíveis em indivíduos doentes. ALT e AST também demonstraram aumentos muito acima dos valores normais durante todas as faixas etárias avaliadas. Finalmente, os parâmetros cardíacos

avaliados nos cães distróficos foram significantemente diferentes comparados àqueles encontrados em cães sadios normais, porém sem deficit à fisiologia cardíaca nos GRMDs.

Palavras-chave: GRMD. Distrofia muscular. Cão.

ABSTRACT

BROLIO, M.P. **Monitoring clinical and morphological of muscular dystrophy of the Golden Retriever dog (GRMD).** [Acompanhamento clínico e morfológico da distrofia muscular do cão Golden Retriever (GRMD)]. 2008. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The dog GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) is an excellent model to study the action of cell therapy for application to DMD - from Duchenne Muscular Dystrophy, which occurs in humans; clinic due to the similarity between the two. These diseases have in common the legacy recessive linked to chromosome X, and are caused by the absence of a protein called dystrophin, which is present in sarcolema of muscle fibers. The point of the structure of mutation in the dystrophin gene is responsible for the phenotype GRMD, and you can find individuals with clinical features quite different from each other. Currently there is no specific treatment for Duchenne muscular dystrophy, and the studies on the clinical development of muscular dystrophy and morphological aim, through constant assessments, establish a standardized phenotypic for these animals in order to monitor pre-clinical results properly and maintain a good quality of life for them so that they have conditions to be submitted to the protocols of cell therapy being developed as kennel GRMD Brazil, and with it, knowing clearly the effective action of cell therapy versus the morphological development of this progressive degenerative disease of dogs. It was checked the clinical and morphological of 12 dogs GRMD, 06 females and 06 males, from birth to 12 months of age. Judging by the locomotive system, it was noted that among the first (five months old) and last assessment (12 months), there was a worsening trend with significant asymmetry in posture, increasing the angle of the tarsus and carpus, adduction of the members, decoupling of the pelvic belt, as well as changes in the mobility of active knees during the activity running. Reproductive assessment of dystrophic dogs indicated higher rates of abnormal sperm (defects larger and smaller) compared to normal dogs at 12 months of age, while females expressed sexual maturity to 09 months. The monthly blood monitoring showed values close to ideal for healthy dogs, and the examinations performed with the animals between six and twelve months of age were those who indicated major changes in relation to the baseline for the species. Average concentrations for red blood cells, hemoglobin and hematocrit were lower than the average for this age group. As for serum biochemical assessments, CK is an important tool for diagnosis and monitoring muscular dystrophy in dogs, due to its indisputable fluctuations and increases in individuals patients. ALT and AST also showed increases greatly above the normal values for all ages evaluated. Finally, the cardiac parameters measured in dystrophics dogs were significantly different compared to those found in normal healthy dogs, but without the deficit in cardiac physiology GRMDs.

Keywords: GRMD, muscular dystrophy, dog.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**
2 REVISÃO DE LITERATURA **19**
3 OBJETIVOS **26**
4 MATERIAIS E MÉTODOS **27**
4.1 GRUPO DE ANIMAIS 27
4.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO 29
4.2.1 Avaliação dos animais **29**
4.2.1.1 Avaliação do Aparelho Locomotor 30
4.2.1.2 Avaliação Reprodutiva 31
4.2.1.3 Avaliação Laboratorial 33
4.2.1.4 Avaliação Cardíaca 34
5 RESULTADOS **39**
5.1 AVALIAÇÃO DO APARELHO LOCOMOTOR 39
5.1.1 ADM – Amplitude de movimento **39**
5.1.2 Postura **44**
5.2 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA 47
5.2.1 Avaliação Andrológica **47**
5.2.2 Avaliação ginecológica **48**
5.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL 51
5.3.1 Hemograma **51**
5.1.2 Bioquímica Sérica **60**
5.4 EXAMES DA FUNÇÃO CARDÍACA 65
5.4.1 Eletrocardiograma **65**
5.4.2 Radiografia Torácica **68**
5.4.3 Ecocardiograma **69**
6 DISCUSSÃO **80**
6.1 AVALIAÇÃO DO APARELHO LOCOMOTOR 80
6.2 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA 82
6.2.1 Avaliação Andrológica **83**
6.2.2 Avaliação Ginecológica **86**
6.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL 87
6.3.1 Hemograma **87**
6.3.2 Bioquímica Sérica **90**
6.4 AVALIAÇÃO CARDÍACA 94
7 CONCLUSÕES **98**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **101**

1 INTRODUÇÃO

A distrofia muscular do cão Golden Retriever (Golden Retriever Muscular Dystrophy – GRMD) é uma miopatia hereditária com características muito semelhantes à da distrofia muscular de Duchenne (DMD), que acomete seres humanos. Estas doenças têm em comum a herança recessiva ligada ao cromossomo X, e são causadas pela ausência de uma proteína chamada distrofina, que está presente na membrana das fibras musculares. A ausência desta proteína causa progressiva degeneração muscular, miocardiopatia dilatada e usualmente a morte prematura do paciente (SHELTON; ENGVALL, 2002).

Os primeiros sinais da GRMD aparecem normalmente entre a 6ª e a 9ª semanas de vida. Algumas lesões já se manifestam "*in útero*" e outras logo após o nascimento, ocorrendo muitas vezes morte dos pacientes recém-nascidos quando são afetados pela forma mais severa da doença. Os filhotes distróficos são mais lentos que os normais e apresentam um andar rígido, arrastando os membros torácicos e abduzindo os cotovelos. Outra característica clínica é o trismo, que é a incapacidade de abrir completamente a mandíbula (SHELTON; ENGVALL, 2002).

Os sintomas da distrofia muscular do golden retriever são progressivos, com perda gradual de massa muscular e desenvolvimento de contraturas que freqüentemente conduzem a deformações no esqueleto. Um aspecto amplamente observado em cães com GRMD é o alargamento da base da

língua em virtude da hipertrofia e pseudo-hipertrofia das fibras musculares. Sialorréia, disfagia, regurgitação e dispnéia podem ocorrer como resultado da hipertrofia da língua associada à disfunção da faringe e do esôfago e à hipertrofia do diafragma. Esta deficiência pode ser constatada desde o nascimento, através da observação do comportamento dos filhotes, que não conseguem alimentar-se corretamente, apresentando dificuldade para sugar o leite das glândulas mamárias da mãe. Este deficit na alimentação causa grande perda de peso e conseqüente morte, que ocorre em sua maior parte até as primeiras duas semanas de vida. A função respiratória fica reduzida e pode ocorrer pneumonia por aspiração, e a presença de miocardiopatia dilatada pode resultar em falência cardiorrespiratória. Casos de insuficiência cardíaca congestiva e arritmias são comuns tanto em humanos quanto em cães (SHELTON; ENGVALL, 2002).

O diagnóstico precoce da distrofia pode ser realizado através de exames bioquímicos e imunohistoquímicos, nos quais podem ser verificados altos níveis de creatina quinase sérica e falta da proteína distrofina, respectivamente, característicos da doença (KORNEGAY et al., 1999).

Atualmente não existe um tratamento específico para a distrofia muscular, tanto em humanos quanto em cães afetados. Os estudos conduzidos no Canil GRMD Brasil poderão trazer informações importantes para uma conduta terapêutica mais apropriada para os meninos afetados pela DMD. Estas informações poderão ser obtidas através dos projetos de pesquisa com transplante de células-tronco, da avaliação clínica dos cães afetados e pela terapia fisioterápica dos mesmos. Já foi constatado que em humanos a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes da DMD têm melhorado com a

aplicação de fisioterapia, porém nada é citado em literatura sobre a eficácia da terapia celular em relação à regeneração muscular. Sendo assim, o objetivo deste estudo é pontuar a evolução desta doença nos cães GRMD, caracterizando as alterações clínicas, morfológicas e funcionais durante a vida dos animais, podendo então correlacionar seus efeitos deletérios à aplicação das células-tronco. A evolução clínica correta dos animais é a chave da real ação da terapia celular; aliada às confirmações físicas obtidas pela biologia molecular de possíveis fibras musculares regeneradas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Durante o ano de 2003, a seqüência completa do genoma canino foi identificada, facilitando a caracterização da base molecular das doenças hereditárias nesta espécie. O padrão da herança depende principalmente de dois fatores: se a mutação é localizada em um autossomo ou em um cromossomo X; ou pela incidência do fenótipo, que normalmente é mais alta em machos do que em fêmeas (GIGER, 2003).

A distrofia muscular relacionada ao cromossomo X em cães da raça Golden Retriever (GRMD) é o modelo animal geneticamente homólogo à distrofia muscular de Duchenne (DMD) que acomete seres humanos (HOWELL et al., 1997; COZZI et al., 2001; NGUYEN et al., 2002; SHIMATSU et al., 2003).

A forma mais comum de distrofias musculares em cães e humanos é causada por mutações no gene da distrofina (SHELTON et al., 2001).

A DMD é a forma mais comum de distrofia muscular em seres humanos, afetando geralmente indivíduos do sexo masculino. Em 1987, foi demonstrado que ela é causada pela ausência ou mutação do gene de uma proteína muscular chamada distrofina. O gene da distrofina localiza-se no cromossomo X, portanto a DMD é uma doença genética de herança recessiva ligada ao X e por isso é transmitida pela mãe portadora, que normalmente é assintomática. Raramente ocorrem manifestações clínicas de alterações musculares em eletromiografias ou biópsias de músculos em indivíduos do sexo feminino (SHELTON; ENGVALL, 2002). Além disso, fêmeas com deficiência de

distrofina ou outras formas de distrofia muscular podem ser mal-diagnosticadas ou não diagnosticadas (SHELTON et al., 2001).

A distrofina é encontrada no sarcolema das miofibras e é fator crucial na estabilização das fibras musculares durante a contração (SHELTON; ENGVALL, 2002). A ausência desta proteína causa progressiva degeneração muscular (KORNEGAY et al., 1999; SHELTON; ENGVALL, 2002) caracterizada morfologicamente por hipercontratibilidade das fibras musculares, causando necrose, posterior regeneração e fibrose tecidual (SHELTON; ENGVALL, 2002; SCHATZBERG; SHIMATSU et al., 2003; SHELTON 2004) observaram, ainda, presença de nódulos calcificados em alguns músculos.

Shelton e Engvall (2002) afirmam que a maior razão de esta miopatia ser a mais comum em seres humanos e animais de companhia se deve ao tamanho extremamente grande do gene da distrofina, sendo, assim, alvo mais freqüente de mutações no código genético em relação àqueles com peso molecular menor.

Modelos animais têm tido e continuarão a ter um papel chave no entendimento da patogênese e tratamento da DMD. O camundongo *MDX* e o cão GRMD são mutações espontâneas de deficiência em distrofina, e têm sido os modelos mais amplamente usados para dados. Os modelos animais têm permitido um grande número de abordagens terapêuticas experimentais promissoras para a DMD, que agora estão entrando em ensaios clínicos, a maioria das quais não teria sido desenvolvida sem a utilização destes animais (WELLS; WELLS, 2005).

Além do Golden Retriever, a distrofia muscular causada pela deficiência de distrofina foi identificada em um grande número de raças caninas como Rottweiler, Pointer alemão de pêlo curto, Irish Terrier, Samoieda, Groenendaeler Shepherd, Schnauzer miniatura, Brittany Spaniel, Rat Terrier, Pembroke Welsh Corgi, e, recentemente, também foi observada no Labrador Retriever (SHELTON; ENGVALL, 2002; SCHATZBERG; SHELTON, 2004).

A distrofia muscular hipertrófica em felinos (HFMD), assim como a distrofia muscular ligada ao X em camundongos, não apresenta debilidade muscular significativa (SHIMATSU et al., 2003); portanto não são modelos ideais para estudos clínicos sobre terapia celular e/ou gênica.

Porém, o GRMD tem sido mais extensamente estudado e melhor caracterizado. Cães não são animais de laboratório ideais, pois são animais de grande porte, suas colônias são caras para se manterem, a espécie não é fácil de se manipular geneticamente e os animais são extremamente sensíveis e emotivos. O cão GRMD, entretanto, exibe mudanças musculares importantes, as quais não são encontradas nos camundongos *mdx*. Cães adultos também têm uma massa corpórea comparável aos pacientes de DMD (COLLINS; MORGAN, 2003), o que os torna um modelo experimental ideal.

A patogenia da GRMD manifesta-se ainda "*in útero*" com o desenvolvimento de lesões na língua (COLLINS; MORGAN, 2003). Nos neonatos, pode-se notar uma distribuição seletiva das lesões, sendo os músculos mais afetados aqueles que são mais ativos durante o período neonatal (diafragma, língua, musculatura do pescoço, tronco e porção proximal dos membros), responsáveis pela respiração, sucção e locomoção, respectivamente (VALENTINE; COOPER, 1991; NGUYEN et al., 2002). Isto

fica mais pronunciado entre os dois e trinta dias de vida, pois o número de fibras necróticas declina quando o animal atinge a maturidade (COZZY et al., 2001).

Duas lesões adicionais foram observadas em filhotes GRMD de dois meses de idade: discreta fibrose endomisial e pronunciada atrofia das miofibras. Em ambas as análises, as lesões musculares incluíam hialinização, hipertrofia, calcificação, necrose e regeneração de pequenos grupos de miofibras distribuídos aleatoriamente nos músculos (NGUYEN et al., 2002). Aos seis meses de idade, ocorrem fibroses severas e contraturas nos membros (VALENTINE et al., 1988). A morte espontânea de filhotes GRMD dentro das primeiras duas semanas de vida ocorre freqüentemente (VALENTINE et al., 1988), quando uma alta concentração de CK permite o diagnóstico precoce da doença (NGUYEN et al., 2002). Esta anormalidade bioquímica sugere que todos os filhotes GRMD apresentam mionecrose neonatal (VALENTINE et al., 1988), além de degeneração muscular "*in útero*" (VALENTINE et al., 1988; NGUYEN et al., 2002).

Um estudo avaliou lesões patológicas e características ultra-estruturais e de microscopia de luz de lesões de musculatura esquelética em distrofia muscular canina ligada ao X (CXMD); foram estudados cães de três meses a seis anos de idade. Necrose e regeneração estavam presentes em todos os estágios, mas foram mais proeminentes nos cães mais jovens. Mudanças progressivas incluíram desenvolvimento de severa variação no tamanho da fibra, fibrose endomisial e perimisial, desorganização citoplasmática proeminente, proliferação mitocondrial, infiltração gordurosa suave e alterações no padrão do tipo de fibra. Evidências de regeneração anormal foram

encontradas em animais jovens e associadas com fibrose extensiva. Estes achados documentam a progressão das lesões na CXMD, e ilustram as profundas alterações na organização e tipos de fibras que podem ocorrer em estágios finais de distrofia muscular deficiente em distrofina (VALENTINE et al., 1990).

A CK está presente nos músculos e é liberada em maior quantidade para o sangue toda vez que ocorre uma lesão reversível e necrose muscular. A enzima tem meia-vida curta, sua atividade é reduzida em 50% após seis horas "*in vitro*". Por este motivo, sua mensuração deve ser efetuada sem atraso. Foram descritas três isoenzimas na CK: a isoenzima MM, que é encontrada na musculatura esquelética e no miocárdio; a isoenzima MB, que também está presente em músculos esqueléticos e no miocárdio, mas em menores concentrações; e, por último, a isoenzima BB, de menor significado para distrofia muscular, que é encontrada no tecido cerebral (COLLINS; MORGAN, 2003).

Análises para a confirmação do diagnóstico de distrofia muscular podem ser realizadas através de exame imunohistoquímico para a detecção da proteína distrofina, sendo este um método sensível que pode ser efetuado diretamente, ou a partir de amostras congeladas provenientes de biópsias (SCHATZBERG; SHELTON, 2004). Em alguns casos pode ser detectada a presença da proteína em menos de 1% do total da amostra proveniente de animais afetados, sendo a expressão da distrofina nestas fibras "revertentes" atribuída a mutações somáticas do gene da distrofina (HOFFMAN et al., 1990).

A GRMD é acompanhada geralmente por miocardiopatia dilatada, e os cães distróficos podem morrer por insuficiência cardíaca. As anormalidades

ecocardiográficas observadas incluem áreas hiperecóicas, a maioria evidente na parede ventricular esquerda, demonstrando os primeiros sinais entre seis e doze meses de idade. Estes achados são consistentes com as lesões histológicas do coração, que podem aparecer aos seis meses de idade e são caracterizadas por necrose e mineralização miocárdica. Cães com mais de um ano de idade desenvolvem fibrose miocárdica, mais evidente no subepicárdio da parede ventricular esquerda, nos músculos papilares e no septo interventricular. Estas lesões são idênticas às encontradas em pacientes humanos com DMD (SCHATZBERG; SHELTON, 2004).

A mortalidade cardíaca na distrofia muscular de Duchenne (DMD) tem-se tornado importante, recentemente , devido à redução do risco de falência respiratória em virtude do uso de respiradores. O envolvimento cardíaco é caracterizado por anormalidades eletrocardiográficas distintas ou cardiomiopatia dilatada, mas a patogenia permanece obscura. Os fenótipos dos GRMDs são muito similares aos da DMD, e os animais também mostram achados eletrocardiográficos similares e cardiomiopatia progressiva comparáveis ao envolvimento cardíaco de pacientes DMD (YUGETA et al., 2006).

Em distrofinopatias, em adição às doenças da musculatura esquelética, alterações cardíacas são comuns, mas assintomáticas em um período variável antes da ocorrência de cardiomiopatia dilatada, resultando em fibrose difundida com final fatal. Assim, o envolvimento cardíaco não é paralelo à doença muscular e sua severidade não é prognosticada por análise genética; uma 'alternativa acessível pode ser o uso de ultra-sonografia cardíaca, o "TDI – Tissue Doppler Imaging", para diagnosticar com antecedência anormalidades

miocárdicas sutis e assintomáticas. O TDI permite a quantificação da velocidade miocárdica regional sistólica e diastólica e índices de deformação, como o gradiente de velocidade miocárdica e velocidade de distensão. Ambas as velocidades e índices de deformação têm sido mostrados para proporcionar um método mais objetivo e quantitativo para avaliar disfunção regional de ventrículo esquerdo. Gradiente de velocidade endocárdica a epicárdica pode identificar disfunção de ventrículo esquerdo antes da fração de ejeção estar alterada (CHETBOUL et al., 2004).

3 OBJETIVOS

- Analisar clinica e morfologicamente o desenvolvimento da distrofia muscular do Golden Retriever nos cães do Canil GRMD-Brasil, situado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

- Estabelecer a relação morfológica e clínica da distrofia muscular em cães;

- Avaliar e manter a qualidade de vida e bem-estar dos cães afetados pela doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto proposto foi conduzido sob avaliação e aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.1 GRUPO DE ANIMAIS

Foram utilizados doze cães neonatos distróficos, provenientes do Canil GRMD – Brasil; do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP; setor de Anatomia dos Animais Domésticos.

Os animais (seis fêmeas e seis machos) eram provenientes de quatro ninhadas diferentes, e todos os nascimentos ocorreram na mesma época, num intervalo menor de dez dias entre o primeiro e último parto.

Para este experimento, os cães foram acompanhados desde o nascimento até completarem doze meses de idade.

Devido ao grande número de projetos em desenvolvimento e à dificuldade em se obter filhotes distróficos, alguns animais durante seu primeiro ano de vida também foram utilizados em outras pesquisas, concomitantemente a esta.

A tabela a seguir identifica os animais avaliados.

Tabela 1 - Relação e dados dos cães da raça Golden Retriever com distrofia muscular incluídos no presente estudo – São Paulo, 2008

CÃO / TATUAGEM	TERAPIA CELULAR	DATA DE NASCIMENTO	SITUAÇÃO
TRAKINAS (F) 1X1	Sim	09/04/2006	VIVA
BIS (M) 2L2	Não	11/04/2006	VIVO
CHOQUITO (M) 2L3	Sim	11/04/2006	VIVO
AMANDITA (F) 2L4	Sim	11/04/2006	ÓBITO EM AGO/07
LAKA (F) 2L5	Não	11/04/2006	ÓBITO EM FEV/07
LANCY (F) 2L6	Sim	11/04/2006	ÓBITO EM DEZ/06
TODDY (M) 2L7	Sim	11/04/2006	ÓBITO EM ABR/07
KINDER (M) 3H5	Não	15/04/2006	ÓBITO EM OUT/06
LOLA (F) 3H6	Sim	15/04/2006	VIVA
SUFLAIR (M) 3H10	Sim	15/04/2006	VIVO
MILKA (F) 3H12	Não	15/04/2006	ÓBITO EM MAIO/07
GALACK (M) 1CL3	Não	17/04/2006	ÓBITO EM FEV/07

Nota: (F): fêmea, (M): macho

Os filhotes foram monitorados a partir do seu nascimento, quando ocorreu coleta do sangue de cordão umbilical (SCU) de cada neonato, a fim de se obterem dados para várias pesquisas em andamento no canil; além da extração de DNA para confirmação da distrofia.

A confirmação de distrofia muscular foi realizada através de análise de DNA por meio do "kit" "GFX Genomic Blood DNA Purification", conforme descrito por Kornegay et al. (1999), em exame feito no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Além disso, todas as matrizes e afetados, jovens ou adultos, tiveram seus parâmetros morfológicos, fisiológicos e patológicos avaliados constantemente, pois as informações obtidas serviram para comparações sobre o desenvolvimento da doença degenerativa progressiva em cães.

4.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

4.2.1 Avaliação dos animais

Cada cão possuía uma ficha individual, onde eram anotados os dados para obtenção do curso clínico da doença através de informações referentes ao manejo alimentar, ingestão hídrica, possíveis afecções adquiridas e seus respectivos tratamentos (quando houve); e, também, participação e desempenho nas atividades terapêuticas realizadas no canil.

Inspeção e exame físico foram realizados semanalmente, baseados numa avaliação sistemática de todo o animal: o estado geral de cada paciente, nível de consciência, hidratação, estado nutricional e observação das áreas afetadas pela distrofia muscular.

O exame físico dos animais consistiu na aferição da temperatura corpórea através da ampola retal, pulso arterial por meio de palpação da artéria femoral, freqüências cardíacas e respiratórias e avaliação de mucosas oculares, orais e genitais. Realizou-se, também, o exame do tórax e abdômen por meio de auscultação indireta, inspeção, palpação e percussão dígito-digital.

4.2.1.1. Avaliação do Aparelho Locomotor

Os cães foram avaliados mensalmente, dos cinco aos doze meses de idade. Foram mensuradas amplitudes de movimento articular (ADM) passiva do carpo, cotovelo, joelho e tarso, bem como a circunferência dos membros pélvicos e torácicos, além de tórax e peso. Realizou-se, ainda, a avaliação dos animais em estação onde foi observada a presença dos seguintes aspectos: simetria, alterações articulares e postura.

Foi realizada avaliação macroscópica dos músculos afetados pela distrofia através de imagens gravadas e fotografadas mensalmente, observando-se também o trofismo das musculaturas axial e cervical.

Quaisquer alterações de postura (coluna vertebral e membros), de musculatura da face, posicionamento da cabeça e pescoço foram consideradas na evolução do processo de distrofia muscular em animais afetados.

A análise estatística dos valores mensurados na ADM passiva (articulações do carpo, cotovelo, joelho e tarso) foi realizada através do "Teste T para Amostras Pareadas", ou, simplesmente, "Teste T Pareado". Houve também uma análise de estatística descritiva dos valores mensurados ao longo de todos os meses avaliados.

4.2.1.2 Avaliação Reprodutiva

Os animais foram examinados clinicamente, com regularidade , com vistas à verificação dos padrões fisiológicos relacionados à biologia da reprodução.

O exame andrológico incluiu histórico clínico detalhado de cada animal, com obtenção de dados referentes a manejo alimentar, imunização, problemas prévios de saúde e respectivos tratamentos médicos.

Procedeu-se ao exame clínico completo; geral e específico dos órgãos reprodutores, colheita e avaliação do sêmen.

O exame andrológico dos machos avaliou principalmente comportamento, tentativa de monta e espermiogramas, os quais foram realizados a partir dos nove meses de idade, seguindo determinações de Vannucchi, Satzinger e Santos (1998).

O sêmen foi coletado através da técnica de manipulação digital, quando foi separado em três frações com o auxílio de tubos graduados e um funil. A segunda fração, rica em espermatozóides, foi retida para avaliação imediata.

As características macroscópicas (aspecto, volume, viscosidade e coloração) foram avaliadas imediatamente após a coleta do material seminal. Motilidade (porcentagem de espermatozóides móveis) e vigor espermático, qualificado em escala de 0 a 5, também foram avaliados através de microscopia ótica (100 e 400x). Para análise morfológica dos espermatozóides e avaliação de patologia espermática, fez-se um esfregaço de sêmen com a coloração de "Eosina-Nigrosina", avaliada através de microscopia ótica (400x). Os defeitos espermáticos foram avaliados segundo a classificação proposta por Blom (1973).

A concentração espermática foi determinada através de espectrofotometria.

As fêmeas foram avaliadas principalmente por exames semanais de citologia vaginal, a partir dos seis meses de idade, estabelecendo-se um padrão de maturidade sexual para estes animais e sua relação com os efeitos da distrofia.

Quando houve necessidade, a técnica de vaginoscopia foi realizada.

Para a coleta de material vaginal foram utilizados swabs bacteriológicos da seguinte maneira: insere-se um swab bacteriológico no vestíbulo e na vagina caudal para absorver exsudato, depois se rola o swab sobre uma lâmina de microscopia para posterior coloração de panótipo da mesma.

4.2.1.3 Avaliação Laboratorial

a) Hemograma

Por meio de punção da veia jugular foram coletados 2mL de sangue de cada animal, para realização de hemogramas. Como anticoagulante foi utilizado o EDTA a 10%. Os hemogramas foram realizados mensalmente.

As amostras de sangue foram avaliadas por meio de um contador automático da marca ABXVET®, modelo contador hematológico situado no laboratório de análises clínicas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, para determinação do eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas.

Esfregaços de sangue foram preparados e corados pelo corante Wright ou pelo panótipo rápido, para estudo dos elementos figurados do sangue. Em seguida, as preparações citoscópicas foram examinadas à luz da microscopia óptica, utilizando-se microscópio com aumento 100x (imersor) para diferenciação e contagem de leucócitos. O volume globular foi avaliado pela técnica do microhematócrito.

b) Bioquímica sérica

As análises bioquímicas séricas foram feitas em amostras do soro obtidas após sinérese de sangue coletado por punção de sangue venoso, aproximadamente 3ml de sangue. As avaliações ocorreram uma vez ao mês.

Utilizando-se o sistema Labtest[1] para diagnóstico, alíquotas das amostras de soro foram processadas para determinação de creatinina (método de Jaffé[2] modificado); uréia (UV-cinética – pelo método do diacetil modificado); proteína total (Biureto); fosfatase alcalina (Roy modificado); alaninaminotransferase (UV – cinético); aspartatoaminotransferase (UV – cinético) e creatinina quinase (cinético).

4.2.1.4 Avaliação Cardíaca

a) Radiografia torácica

A avaliação radiográfica foi realizada de acordo com a técnica que relaciona miliamperagem/segundo e quilovoltagem à espessura da região torácica (SCHELLING, 1995), em aparelho CGR, de 600 mA e 130 KV, modelo Chenonceaux, equipado com mesa radiológica com grade e sistema *Potter – Buck* recipromático, tipo *Par Speed,* e ampola de Raios-X de ânodo giratório. Os filmes radiográficos utilizados foram do tamanho 24 x 30 cm da marca Kodak ®, de acordo com o porte do animal, colocados em chassis metálicos portando telas intensificadoras CRONEX HI plus. Os filmes foram revelados e fixados em processadora automática RP-OMAT Processor®, após a identificação luminosa apropriada.

---

[1] LABTEST Diagnostica S.A. – Lagoa Santa , MG
[2] Método do picrato alcalino

Para a avaliação de silhueta cardíaca, os cães foram submetidos ao exame radiográfico da região torácica. Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e esquerdo para a projeção látero-lateral e em decúbito dorsal para a projeção ventro-dorsal.

b) Pressão Arterial

A avaliação da pressão arterial foi feita através de um aparelho de *Doppler* vascular MEDMEGA ®, modelo DV-610 e esfingonomanômetro TYCOS ® modelo CE0050. A mensuração da pressão arterial foi realizada com o animal em decúbito lateral, posicionando-se o *cuff*, (marca Dixtal®) logo abaixo da articulação úmero-rádio-ulnar, com o transdutor sobre a artéria palmar na região metacarpiana. A largura e o número do *cuff* foram selecionados conforme recomendações de Brown e Henik (1998).

Como valor de referência para hipertensão, considerou-se a pressão sistólica maior que 170 mm Hg (BROWN; HENIK, 1998).

c) Exame eletrocardiográfico

O exame eletrocardiográfico foi realizado utilizando-se eletrocardiógrafo da marca ECAFIX ® modelo 6, com os animais em decúbito lateral direito,

registrando-se as derivações bipolares I, II e III, as unipolares aumentadas aVR, aVL e aVF e as derivações pré-cordiais CV_5RL, CV_6LL, CV_6LU e V_{10} (EDWARDS, 1987; TILLEY, 1995).

Os parâmetros eletrocardiográficos, avaliados em derivação DII, velocidade 50 milímetros por segundo (mm/s) e calibrado para 1 milivolt (mV) igual a 1 centímetro (cm), foram :

a) freqüência cardíaca: a freqüência cardíaca (batimentos por minuto), foi calculada na derivação DII, contando-se o número de complexos QRS, em três segundos e multiplicando-se por 20 (F.C. = nº QRS em 3 segundos x 20) (EDWARDS, 1987);

b) ritmo cardíaco: foram considerados normais os seguintes ritmos cardíacos: ritmo sinusal, arritmia sinusal e arritmia sinusal com marcapasso migratório (TILLEY, 1995);

c) eixo elétrico cardíaco médio: foi calculado pelo tamanho das deflexões dos complexos QRS, nas derivações bipolares I, II e III e unipolares aumentadas aVR, aVL, aVF conforme Tilley (1995);

d) onda P: foram analisadas a duração, em segundos, e a amplitude, em milivolts (TILLEY, 1995);

e) intervalos P-R: foi analisada a duração, em segundos (TILLEY, 1995);

f) complexo QRS: foram analisadas a duração, em segundos, e a amplitude da onda R ,em milivolts (TILLEY, 1995);

g) segmento ST: considerou-se a elevação ou depressão em relação à linha de base isoelétrica do registro eletrocardiográfico (TILLEY, 1995);

h) onda T: foi classificada quanto à sua polaridade em positiva, negativa ou bifásica e a amplitude sempre menor que 25 % da onda R (TILLEY, 1995);

i) intervalo Q-T: foi analisada a duração, em segundos (TILLEY, 1995);

j) derivações pré-cordiais: as derivações CV_5RL, CV_6LL, CV_6LU e V_{10} também foram analisadas na velocidade 50 mm/s com sensibilidade 1 mv igual a 1 cm, sendo determinada a amplitude (mV) das ondas Q, R e S e a polaridade da onda T (positiva ou negativa) nas derivações CV_5RL, CV_6LL e CV_6LU, bem como a polaridade (positiva ou negativa) do complexo QRS e da onda T na derivação V_{10} (TILLEY, 1995).

d) Exame ecocardiográfico

Para a realização dos exames ecocardiográficos os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo com o transdutor sobre o tórax, para obtenção das imagens através da janela paraesternal direita e paraesternal esquerda cranial e caudal. Uma grossa camada de gel era aplicada entre a pele dos animais e o transdutor, a fim de minimizar a interferência que o ar exerce no exame ultra-sonográfico.

O exame ecocardiográfico foi realizado conforme recomendações da *Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology – American College of Veterinary Internal Medicine* (THOMAS et al., 1993) e *American Society of Echocardiography (ASE)* (YAMATO et al., 2006; PELLEGRINO et al., 2007).

As ultra-sonografias cardíacas foram realizadas no Setor de Cardiologia do Departamento de Clínica Médica do HOVET – FMVZ-USP. O aparelho utilizado foi um ecocardiográfo modelo "Vivid 7 dimension" (Fabricante GE Medical Systems).

Os cães foram avaliados aos doze meses de idade.

Para análise estatística dos dados obtidos através da ecocardiografia foi utilizado o Teste-T de *Student*, que é uma estatística usada para comparar duas médias, sendo uma delas de referência. Essa avaliação foi feita para comparar a média dos valores ecocardiográficos do grupo estudado com a média dos valores de referência para cães saudáveis, da mesma raça e idade.

Também foi realizada uma comparação entre os valores de machos e fêmeas distróficos. Para esta análise estatística foi utilizada a "Análise de variância – ANOVA".

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nas diferentes avaliações realizadas são apresentados sob a forma de quadros e tabelas, a seguir, e em tópicos sistematizados:

5.1 AVALIAÇÃO DO APARELHO LOCOMOTOR

Comparando os animais entre a primeira (cinco meses) e última avaliação (doze meses), pôde-se observar que houve uma piora com evolução significativa na assimetria postural, aumento do ângulo do tarso e carpo, adução dos membros, dissociação da cintura pélvica, além de alterações na mobilidade ativa dos joelhos durante a atividade de marcha.

5.1.1 ADM – Amplitude de movimento

Através de análise estatística descritiva, observamos que houve aumento significativo da ADM nas articulações do carpo (Figura 1), sendo as médias do grupo: T1 = 135 ± 3,535° a T7 =139,278 ± 4,599°, cotovelo (Figura

2) - médias do grupo: T1 = 116,590 ± 5,276° a T7 = 128,901 ± 6,465° e joelho (Figura 3) - médias do grupo: T1 = 110 ± 5,590° a T7 = 122,115 ± 7,029°.

Houve manutenção dos valores do tarso (Figura 4) - médias do grupo: T1 = 121,136 ± 4,658° a T7 = 129,520 ± 12,143°.

Houve diferença estatística ("Teste T Pareado") na avaliação da ADM, entre a primeira e a última avaliação individual dos animais, nas seguintes articulações: carpo (p = 0.0095), cotovelo –(p = 0.0006) e joelho (p <0.0001) (Figuras 5, 6 e 7) Não houve diferença estatística na avaliação da articulação do tarso (p = 0.0614) (Figura 8).

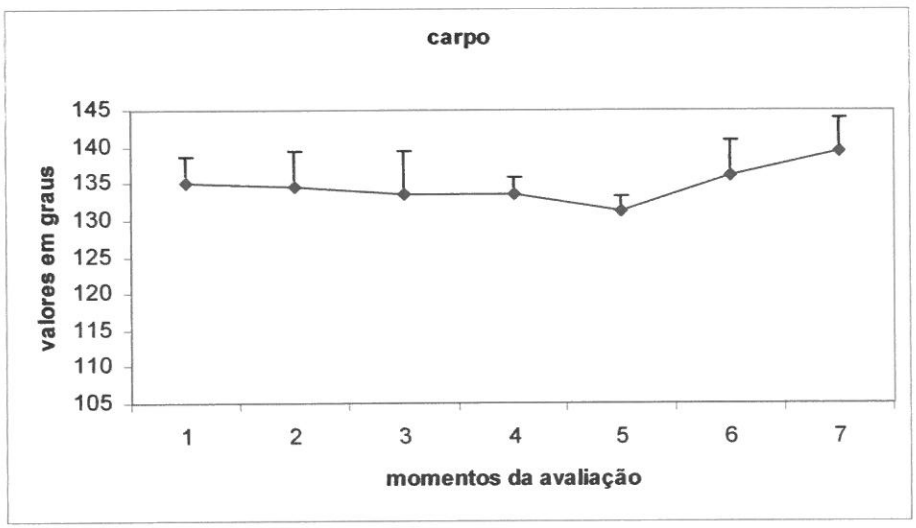

Figura 1 – Articulação do carpo: Goniometria ao longo do tempo: 07 avaliações - setembro de 2006 a abril de 2007. Cada ponto em azul representa a média do grupo em cada avaliação

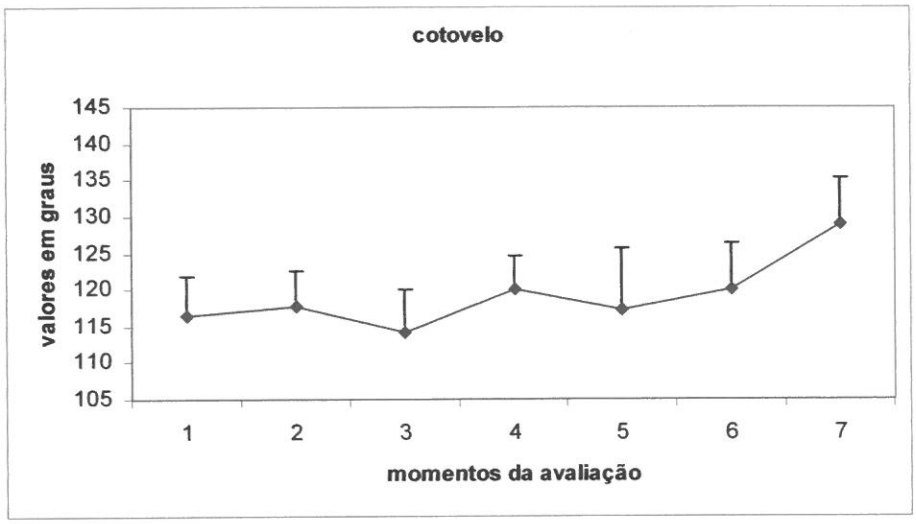

Figura 2 – Articulação do cotovelo: Goniometria ao longo do tempo: 07 avaliações - setembro de 2006 a abril de 2007. Cada ponto em azul representa a média do grupo em cada avaliação

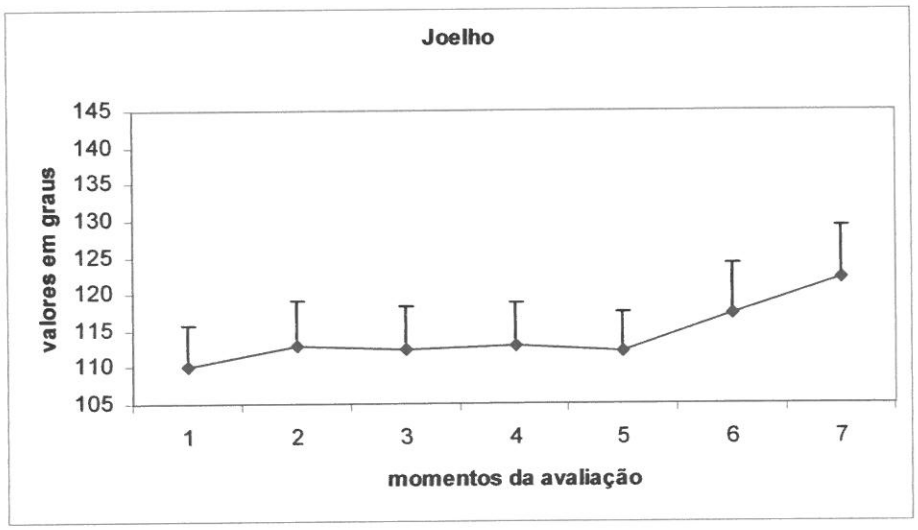

Figura 3 – Articulação do Joelho: Goniometria ao longo do tempo: 07 avaliações - setembro de 2006 a abril de 2007. Cada ponto em azul representa a média do grupo em cada avaliação

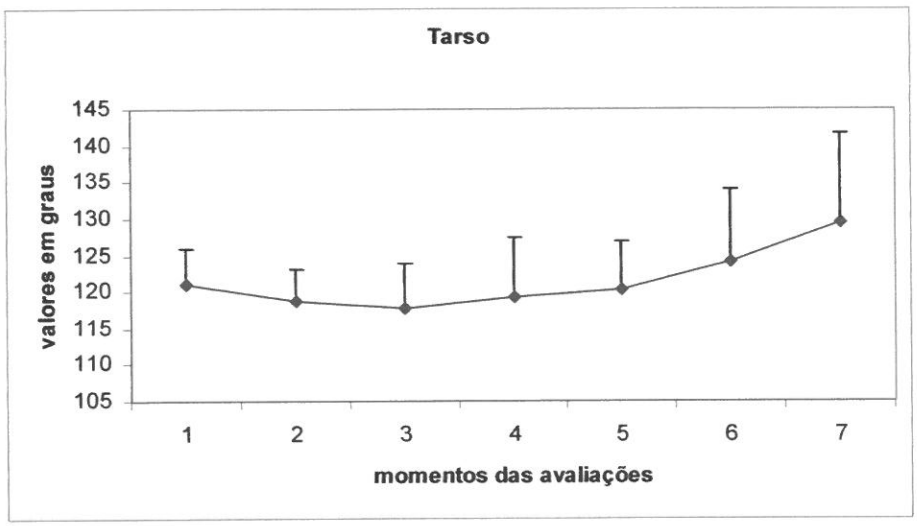

Figura 4 – Articulação do tarso: Goniometria ao longo do tempo: 07 avaliações - setembro de 2006 a abril de 2007. Cada ponto em azul representa a média do grupo em cada avaliação

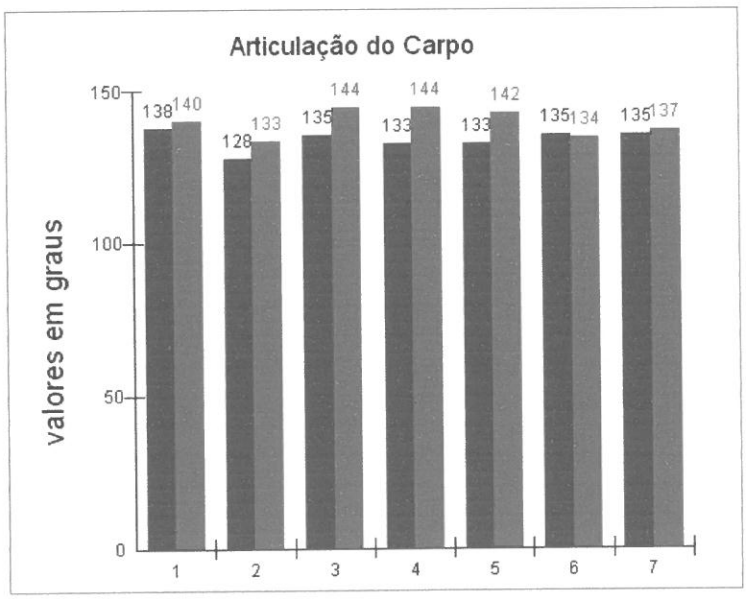

Figura 5 – Articulação do carpo: Gráfico mostrando a variação individual dos sete cães que participaram de todas as avaliações de ADM (colunas pareadas numeradas), evidenciando a oscilação entre a primeira e a última avaliação de cada animal (colunas em preto e verde, respectivamente)

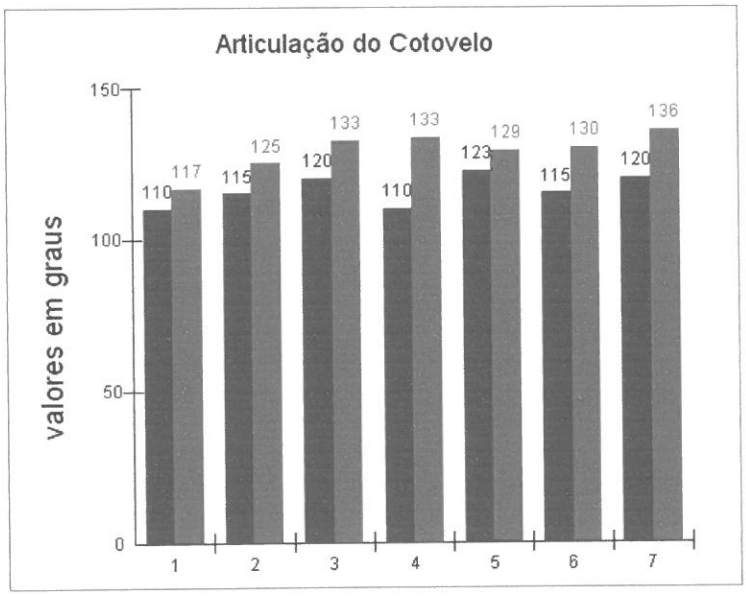

Figura 6 – Articulação do cotovelo: Gráfico mostrando a variação individual dos sete cães que participaram de todas as avaliações de ADM (colunas pareadas numeradas), evidenciando a oscilação entre a primeira e a última avaliação de cada animal (colunas em preto e verde, respectivamente)

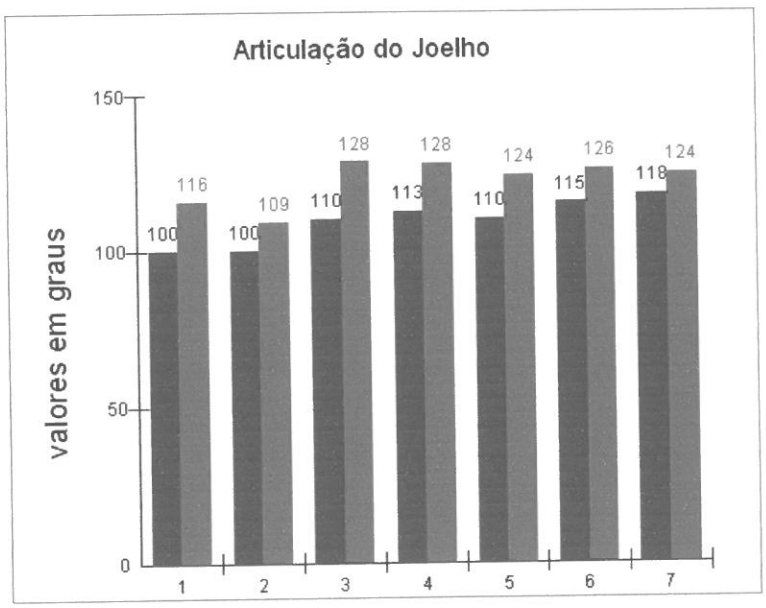

Figura 7 – Articulação do joelho: Gráfico mostrando a variação individual dos sete cães que participaram de todas as avaliações de ADM (colunas pareadas numeradas), evidenciando a oscilação entre a primeira e a última avaliação de cada animal (colunas em preto e verde, respectivamente)

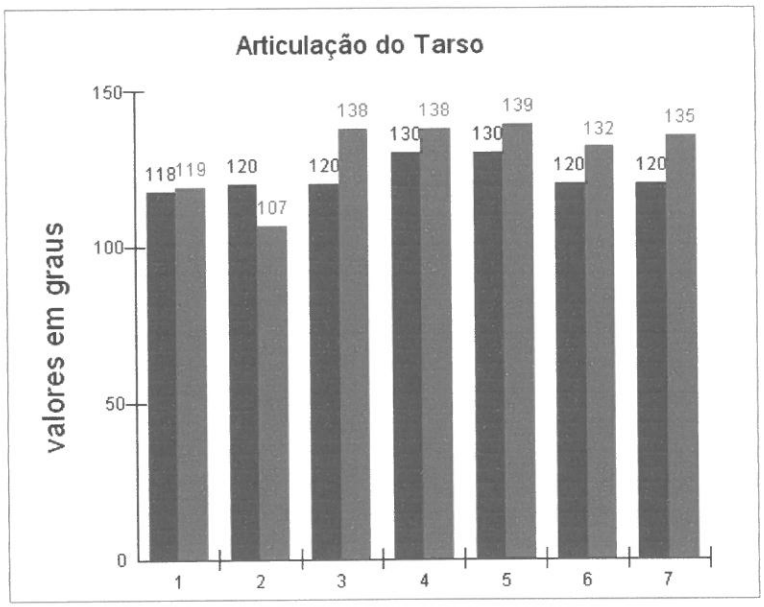

Figura 8 – Articulação do tarso: Gráfico mostrando a variação individual dos sete cães que participaram de todas as avaliações de ADM (colunas pareadas numeradas), evidenciando a oscilação entre a primeira e a última avaliação de cada animal (colunas em preto e verde, respectivamente).

5.1.2 Postura

Os animais foram examinados estáticos, em posição quadrupedal (figuras 9 e 10).

Foi realizada uma avaliação no plano sagital das alterações dos eixos do movimento: eixo frontal (flexão e extensão) e longitudinal (rotação externa e interna).

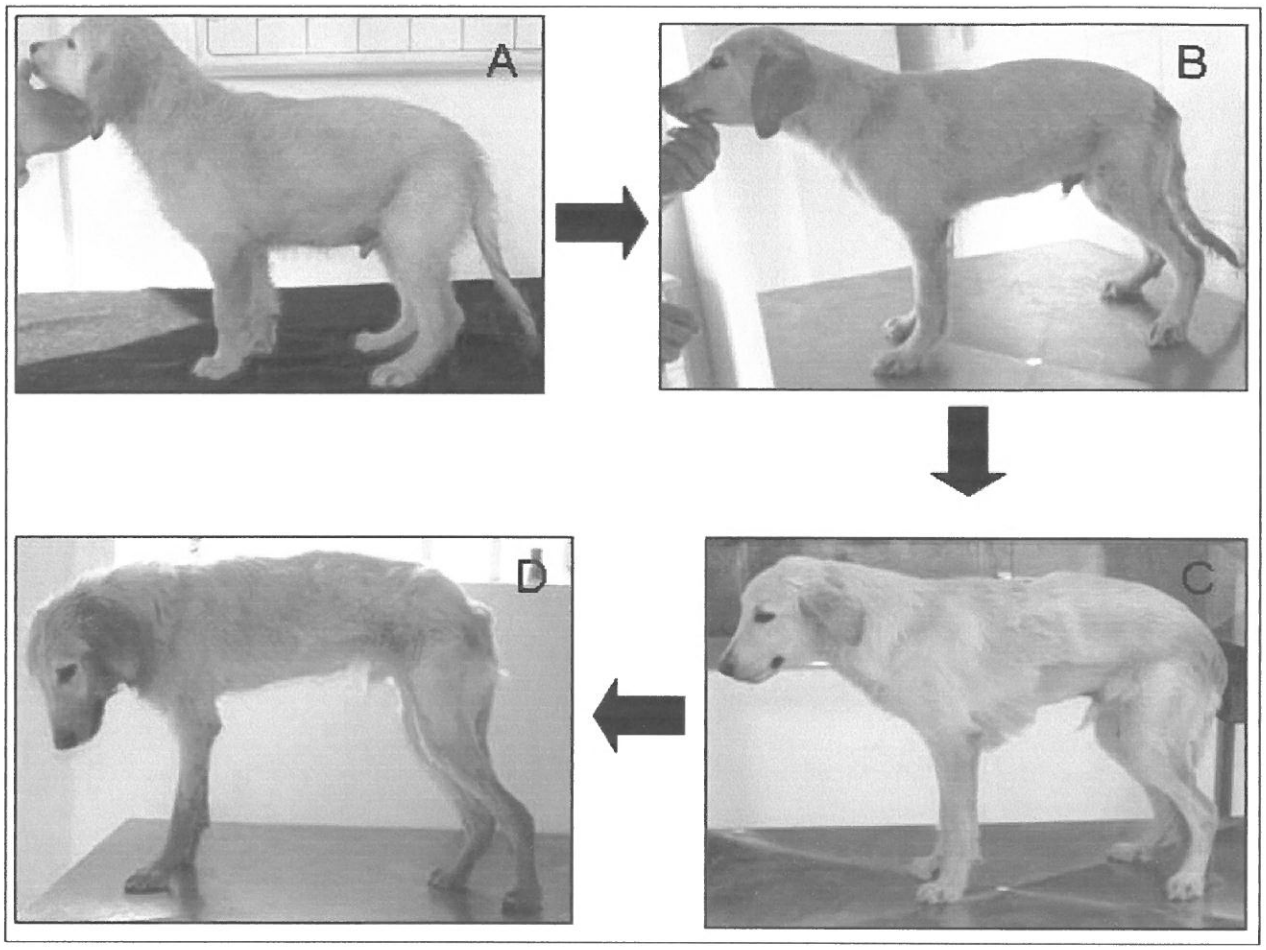

Figura 9 – Animal 1C3 – Plano sagital, vista lateral esquerda. **A** - 2 meses de idade. Sem alterações. **B** – 6 meses, discreta rotação externa de tarso esquerdo. **C** – 9 meses, rotação externa de tarso esquerdo, retroversão pélvica. **D** – 9 meses, rotação externa de tarso esquerdo, joelho em extensão, retroversão pélvica e importante perda de massa muscular.

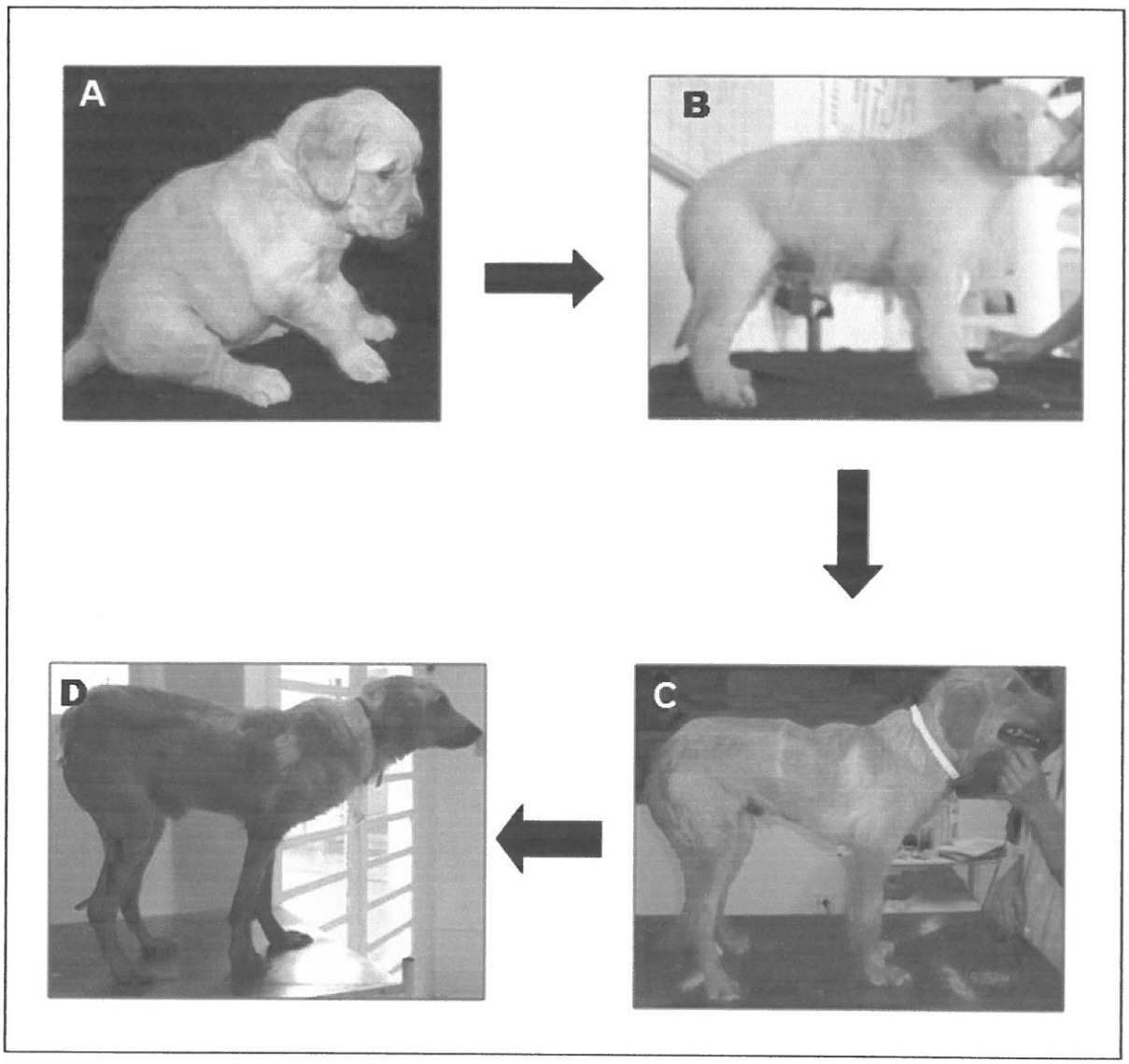

Figura 10 – Animal 2L3 – Plano sagital, vista lateral direita. **A** - 1 mês de idade. **B** - 3 meses de idade. Animal sem alterações aparentes. **C** - 9 meses de idade, discreta lordose e elevação da cauda, diminuição da semiflexão de joelho e rotação externa de tarso. **D** – 12 meses de idade, lordose, elevação da cauda, diminuição da semiflexão de joelho e rotação externa de tarso.

5.2. *AVALIAÇÃO REPRODUTIVA*

Os dados obtidos através da avaliação reprodutiva dos cães estão separados entre fêmeas e machos, para melhor delimitação dos grupos.

5.2.1 Avaliação Andrológica

A primeira avaliação andrológica foi realizada quando os animais estavam com nove meses de idade. A tabela 2 expõe os dados obtidos através dos exames andrológicos feitos. Apenas dois animais responderam positivamente aos estímulos, permitindo coleta de material para realização do espermiograma.

Tabela 2 – Resultados dos espermiogramas realizados nos machos GRMDs incluídos no presente estudo – São Paulo, 2008

Animal	Data	Vol 2ª fração (ml)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Concentração ($x10^6$ sptz/ml)	Def. maiores (%)	Def. menores (%)
2L2	18/01/07[1]	___	___	___	___	___	___
2L3	18/01/07	0,5	60	2	35	91	4
2L7	18/01/07[1]	___	___	___	___	___	___
3H10	18/01/07	2,0[2]	70	4	35	16	13
2L2	11/04/07[1]	___	___	___	___	___	___
2L3	11/04/07	1,0	80	3	55	17	4
3H10	11/04/07	1,0	85	3-4	60	14	9

Obs: [1] - Aspermia

[2] 2ª fração + 3ª fração

5.2.2 Avaliação ginecológica

Todas as fêmeas afetadas passaram por avaliação através de esfregaço vaginal a partir dos seis meses de idade para fins de acompanhamento da maturidade sexual desses animais e também para controle do manejo populacional do canil, uma vez que ao entrar na puberdade as cadelas são separadas dos machos, ficando em pátios e baias diferentes.

Esfregaços vaginais

A tabela 3 resume o momento em que as fêmeas avaliadas manifestaram as diferentes fases do ciclo estral, indicando que houve maturidade sexual. É possível observar que, assim como acontece com fêmeas normais e portadoras, ocorreu uma sincronização dos ciclos das cadelas envolvidas, e todas manifestaram a mesma fase estral na mesma época.

Algumas lâminas dos esfregaços vaginais realizados, após coloração e avaliação, foram fotografadas em microscópio óptico para registro da maturidade sexual e desenvolvimento reprodutivo desses animais (figura 11), uma vez que foram as primeiras fêmeas distróficas do canil e seu comportamento e desenvolvimentos sexuais eram totalmente desconhecidos.

Tabela 3 - Resultado dos esfregaços vaginais realizados nas fêmeas GRMDs avaliadas no presente estudo – São Paulo - 2008

FÊMEA	6 meses de idade	9 meses de idade	9 meses de idade	10 meses de idade
1X1	Anestro	proestro	Estro	diestro
2L4	Anestro	proestro	Estro	diestro
2L5	Anestro	proestro	Óbito	óbito
2L6	Anestro	óbito	Óbito	óbito
3H6	Anestro	proestro	Estro	diestro
3H12	Anestro	proestro	Estro	diestro

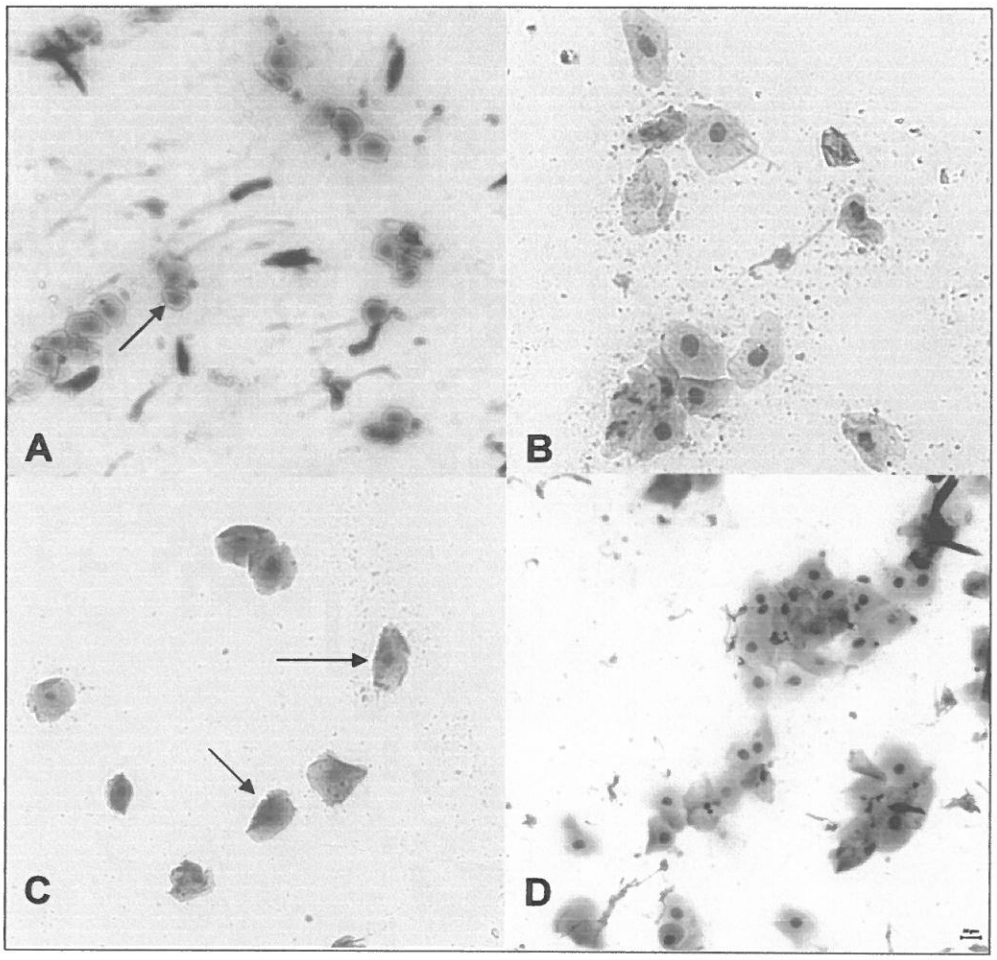

Figura 11 – Esfregaços vaginais provenientes de cadelas GRMDs, evidenciando as 4 fases do ciclo estral canino. Observações: Em A, seta indicando células parabasais, características de anestro. Em B, fase de proestro: células com núcleos fortemente corados e citoplasmas evidentes. Em C, seta evidenciando células superficiais, indicando fase de estro. Em D: Fotomicrografia de esfregaço vaginal canino em fase de diestro demonstrando tipos celulares variados. Coloração de panótipo rápido.

5.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Dados hematológicos e bioquímicos séricos usados como valores normais de referências em patologia clínica para cães são encontrados em diversas referências, e foram considerados para mensuração e definição da caracterização destes dados e seus respectivos valores no modelo canino GRMD.

5.3.1 Hemograma

Os valores médios obtidos para os diversos componentes avaliados nos hemogramas de cães jovens da raça golden retriever afetados pela distrofia muscular (GRMD), bem como valores normais utilizados como referência, estão expressos na tabela 4, a seguir.

Tabela 4 – Valores médios obtidos para alguns parâmetros de hemograma em cães GRMD, em diferentes faixas etárias, incluídos no presente estudo – São Paulo - 2008

HEMOGRAMA	ATÉ 3 MESES	3 A 6 MESES	6 A 12 MESES
He (milhões/mm^3)	4,4	5,1	5,4
valores de referência[1]	*4 – 6*	*5,5 – 7*	*6 – 7*
Hb (g%)	9,8	11,7	11,6
valores de referência[1]	*9,5 – 13*	*11 – 15,5*	*14 – 17*
Ht (%)	30	35	37
valores de referência[1]	*26 – 36*	*34 – 40*	*40 – 47*
VCM (µ^3)	67,88	69,26	69,64
valores de referência[1]	*65 – 78*	*65 – 78*	*65 – 78*
HCM (µµg)	22,13	23,19	24,99
valores de referência[1]	*20 - 24*	*20 – 24*	*21 – 25*
CHCM (%)	32,75	33,56	33,51
valores de referência[1]	*30 - 34*	*30 – 35*	*30 – 35*
Leuc. (mil/mm^3)	16.9	13.9	14.1
valores de referência[1]	*9 – 15*	*9 – 15*	*9 – 15*
Segmentados (%)	60	59	51
valores de referência[1]	*46 – 68*	*47 – 69*	*55 – 70*
Eosinófilos (%)	1	2	3
valores de referência[1]	*1 – 5*	*1 – 5*	*1 – 5*
Linfócitos (%)	33	36	44
valores de referência[1]	*30 - 48*	*28 – 45*	*20 – 40*
Monócitos (%)	5	4	3
valores de referência[1]	*1 – 10*	*1 – 10*	*2 – 8*
Plaquetas	544	439	469
valores de referência[1]	*200.000 –*	500.000	

Nota: *valores de referência[1]*: "Current Veterinary Therapy – Small Animal Practice" – Robert W. Kirk / John D. Bonagura – 1992

Os gráficos a seguir mostram a variação média mensal dos parâmetros hematológicos de células vermelhas e plaquetas, avaliados nos hemogramas dos cães GRMDs durante seus primeiros doze meses de idade, incluídos no presente estudo (Figuras 12 a 17).

Observa-se que durante os três primeiros meses de vida, quase todos os parâmetros avaliados tiveram valores compatíveis com as médias consideradas normais para essa faixa etária. A exceção foi a concentração média de plaquetas, que estava acima do intervalo de referência para esse indicador.

Os resultados médios obtidos com os hemogramas dos cães distróficos entre três e seis meses de idade também apontaram a maioria dos parâmetros hematológicos dentro da normalidade, exceto o valor médio de hemácias, que esteve um pouco abaixo dos valores de referência.

Os exames realizados com os animais entre seis e doze meses de idade foram aqueles que indicaram maiores alterações em relação aos valores normais para cães. Concentrações médias para hemácias, hemoglobina e hematócrito foram menores que a média para a faixa etária em questão.

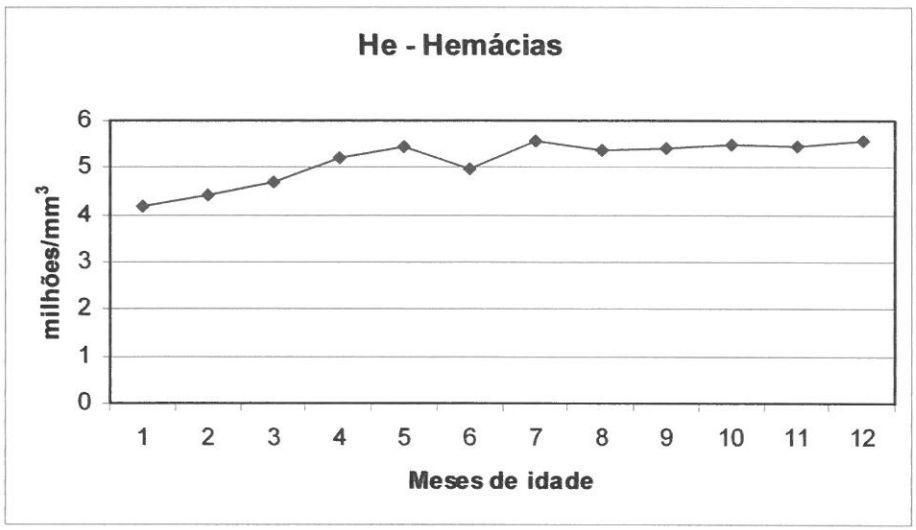

Figura 12 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de hemácias em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em milhões/mm^3

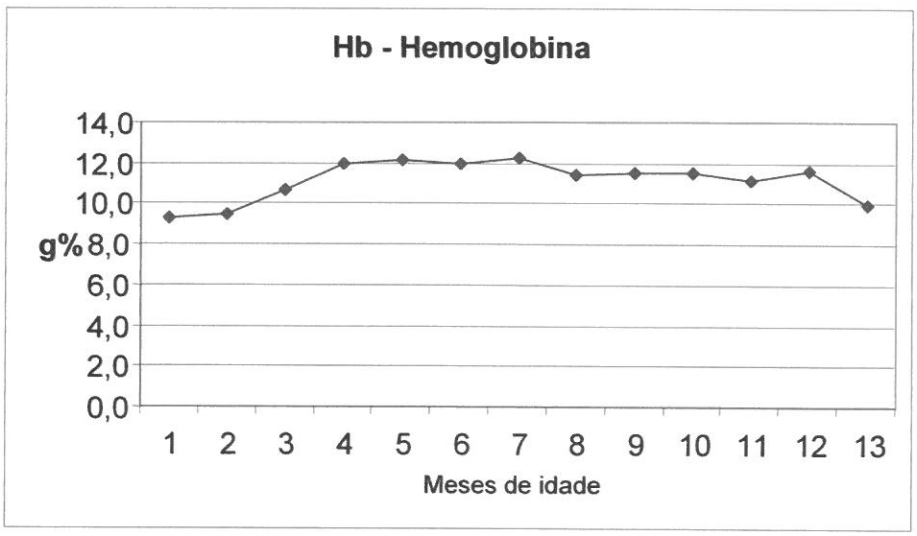

Figura 13 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de hemoglobina em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em milhões/mm^3.

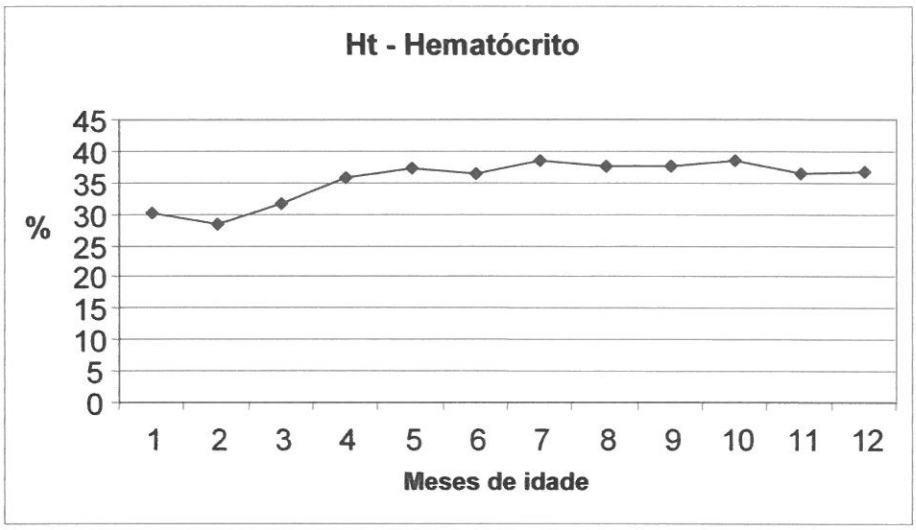

Figura 14 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de hematócrito em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em milhões/mm^3

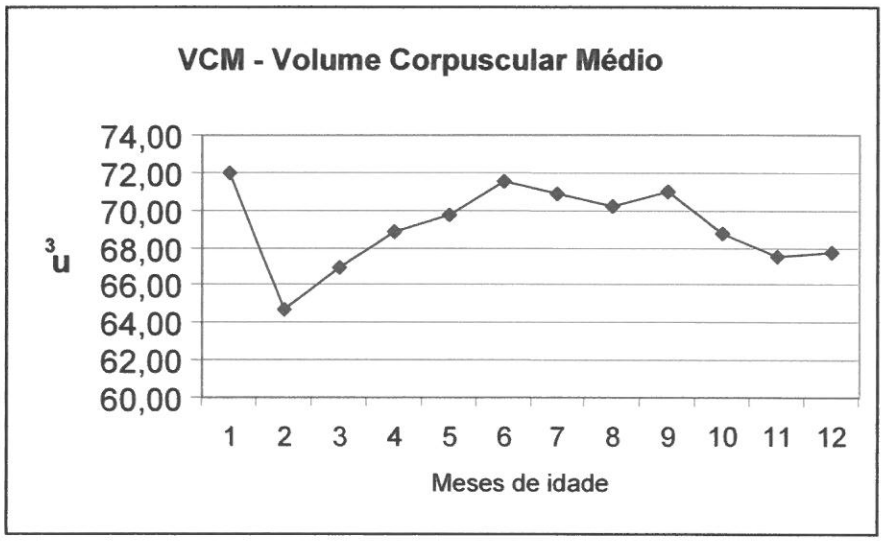

Figura 15 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de volume corpuscular médio das hemácias em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em μ^3

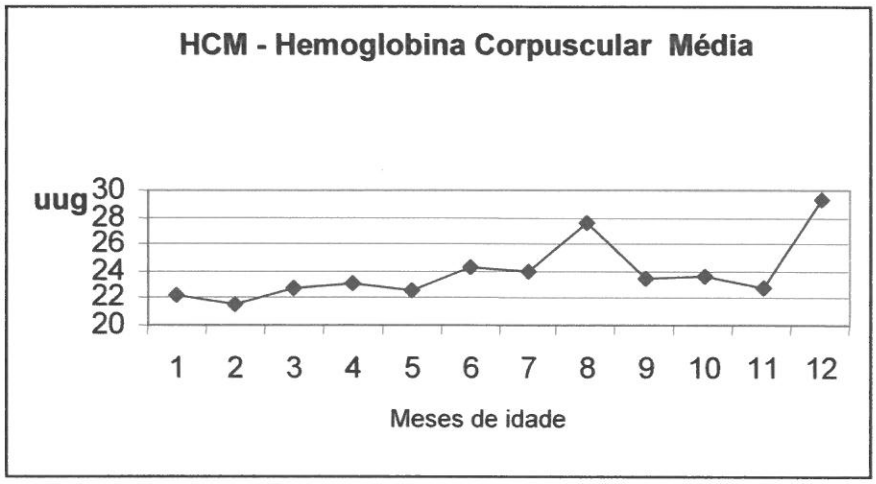

Figura 16 - Gráfico referente às médias mensais dos valores de hemoglobina corpuscular média das hemácias em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em µµg

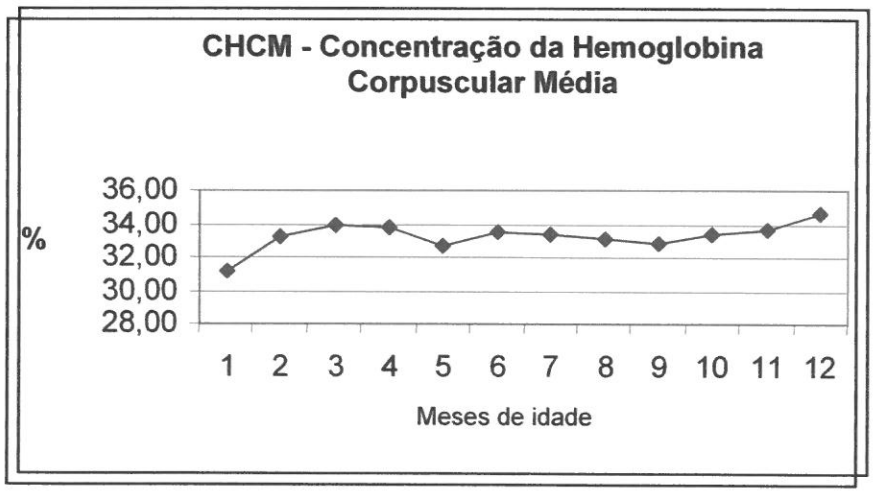

Figura 17 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de concentração de hemoglobina corpuscular média das hemácias em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em %

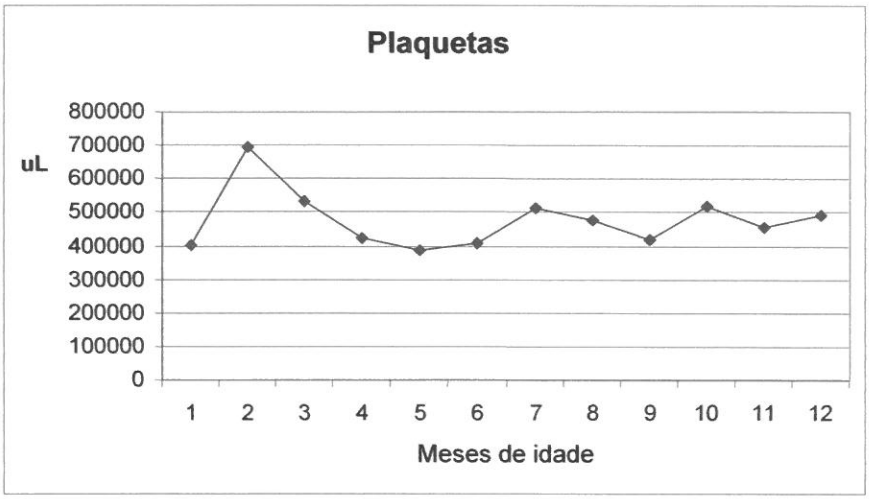

Figura 18 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de plaquetas em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em µL.

Os gráficos adiante mostram a variação média mensal dos parâmetros hematológicos para células brancas avaliados nos hemogramas dos cães GRMDs, durante seus primeiros doze meses de idade, incluídos no presente estudo (figuras 19 a 22).

Nos primeiros três meses de idade observa-se aumento no número total de leucócitos e demais parâmetros normais.

O intervalo entre três e seis meses de vida não indicou nenhum parâmetro de classe branca alterado, enquanto que entre seis e doze meses de idade a porcentagem média de neutrófilos esteve acima dos valores de referência, e a de leucócitos ficou abaixo do intervalo esperado.

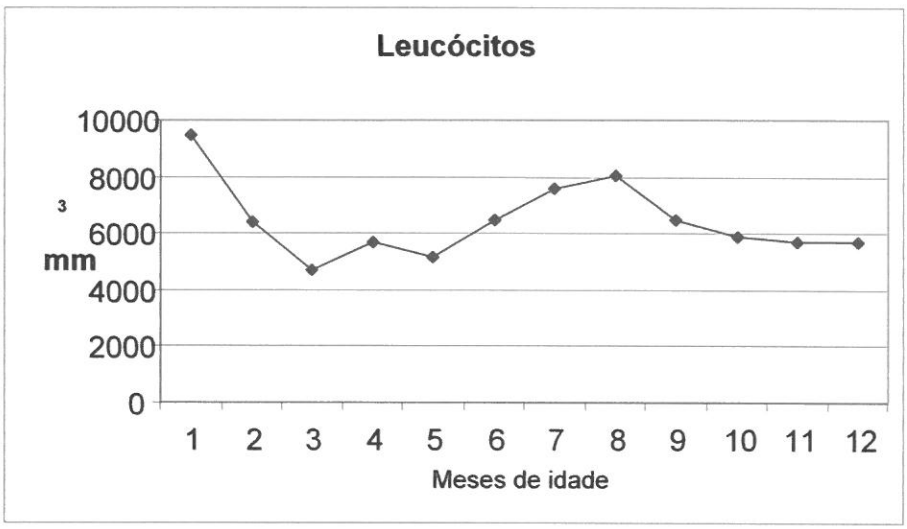

Figura 19 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de leucócitos em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em mil/mm^3

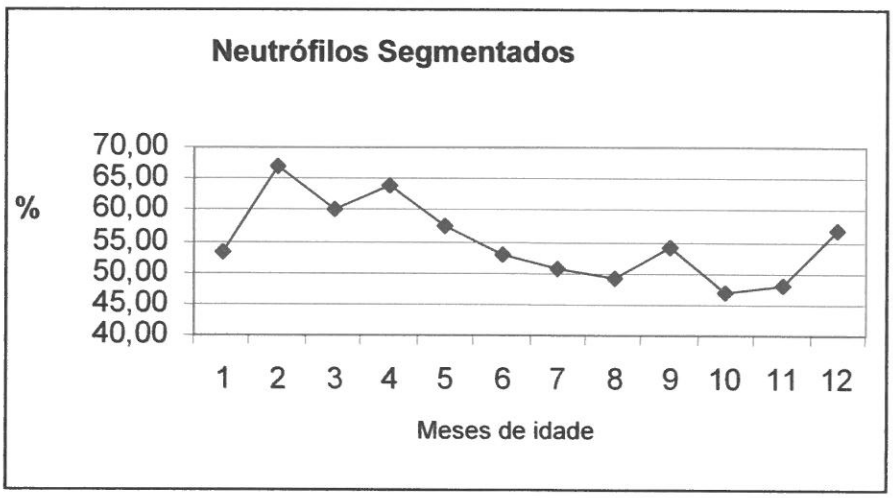

Figura 20 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de neutrófilos segmentados em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em %

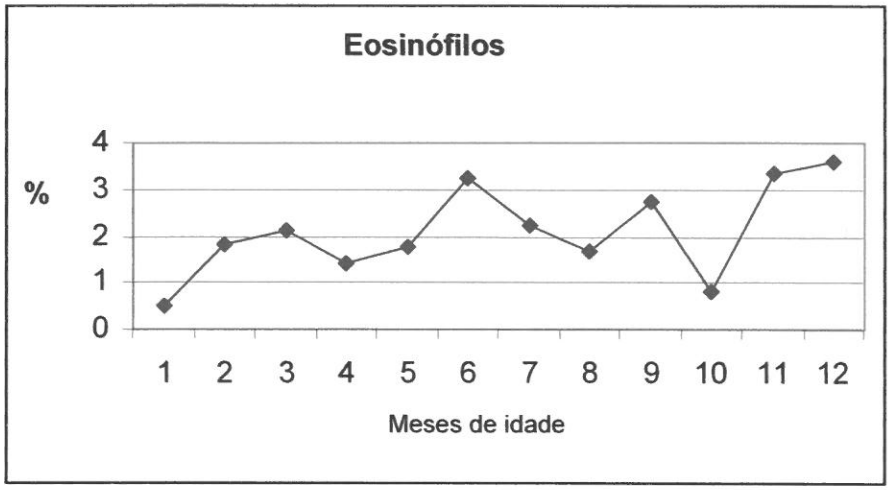

Figura 21 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de eosinófilos em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em %

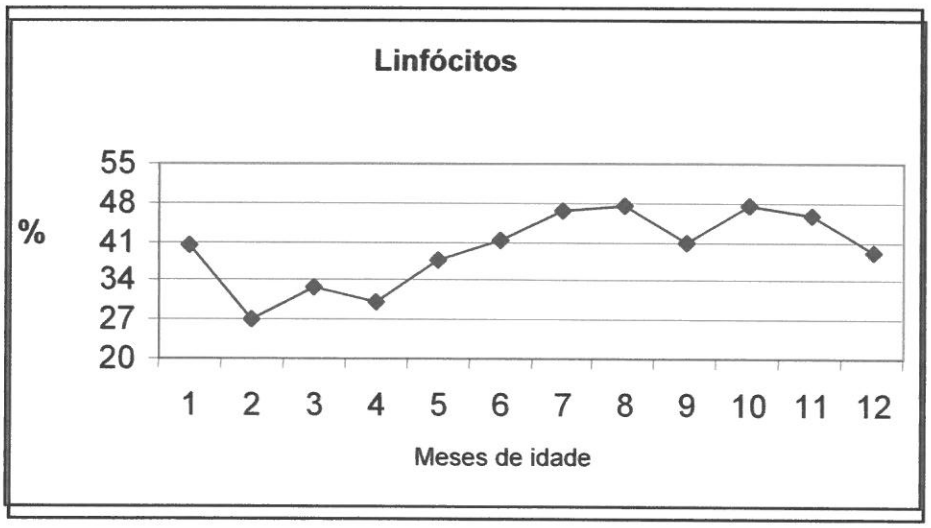

Figura 22 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de linfócitos em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em %

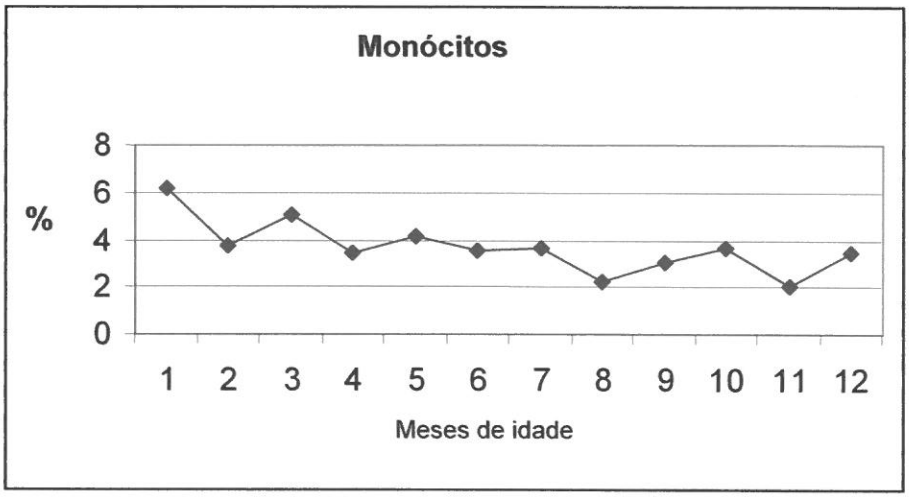

Figura 23 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de monócitos em hemogramas de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em %

5.1.2 Bioquímica Sérica

Os resultados obtidos para os diferentes metabólitos e enzimas séricas dosadas em cães jovens da raça golden retriever afetados pela distrofia muscular (GRMD), assim como valores de referência, estão expressos na tabela 5, adiante.

Tabela 5 – Valores médios obtidos para alguns parâmetros de avaliação bioquímica sérica em cães GRMD, em diferentes faixas etárias, utilizados no presente estudo – São Paulo - 2008

BIOQUÍMICO	ATÉ 3 MESES	3 A 6 MESES	6 A 12 MESES
ALT (U/L)	312,5	522,8	544,5
***valores de referência*[1]**	9,9 – 23,9		
AST (U/L)	------*	503,6	561,8
***valores de referência*[1]**	13 – 21	20 – 29	21 – 29
CK (U/L)	23.173,4	42.256,5	45.318,4
***valores de referência*[1]**	Até 200	Até 200	Até 200
Creatinina (mg/dL)	0,8	0,5	0,6
***valores de referência*[1]**	0,4 – 0,6	0,6 – 0,9	0,6 – 1,0
FA (U/L)	207,9	90,6	38,3
***valores de referência*[1]**	88 – 145	90 – 145	43 – 93
PTs (g/Dl)	5,7	6,4	6,3
***valores de referência*[1]**	3,8 – 4,9	4,6 – 5,4	5,3 – 5,9
Uréia (mg/dL)	38,6	37,1	38,4
***valores de referência*[1]**	10,3 – 20,1		

Nota: *valores de referência*[1]: "Veterinary Laboratory Medicine – Interpretation & Diagnosis" – MEYER, D. J. / HARVEY, J. W. – 1998

Os gráficos a seguir mostram a variação média mensal dos parâmetros bioquímicos avaliados em cães GRMDs durante seus primeiros doze meses de idade, incluídos no presente estudo (Figuras 24 a 29). Podem-se observar oscilações mensais em alguns parâmetros, devido à fase de crescimento dos animais.

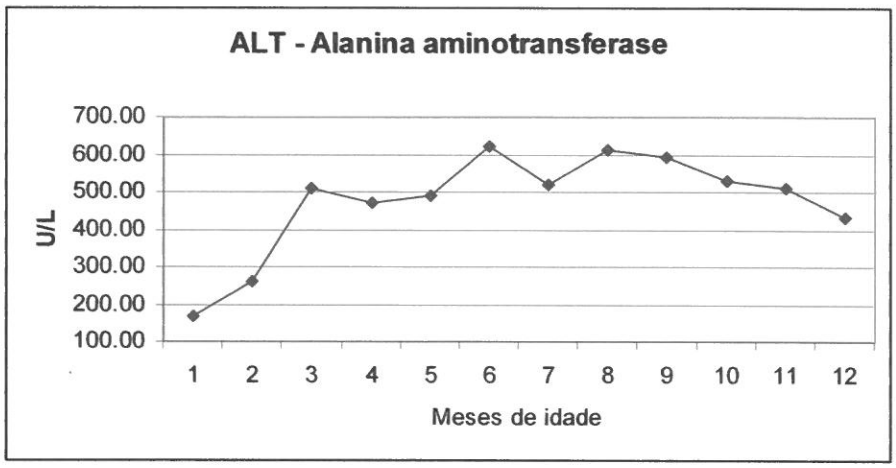

Figura 24 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de ALT no soro de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em U/L.

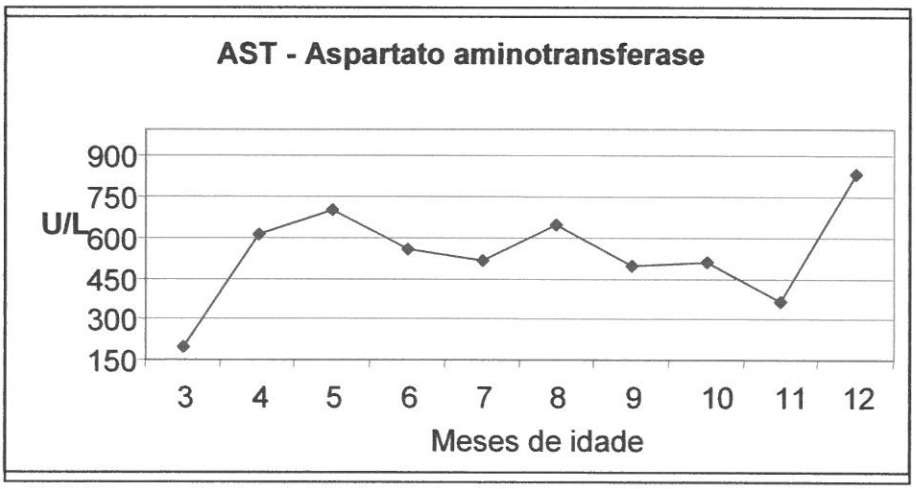

Figura 25 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de AST no soro de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em U/L

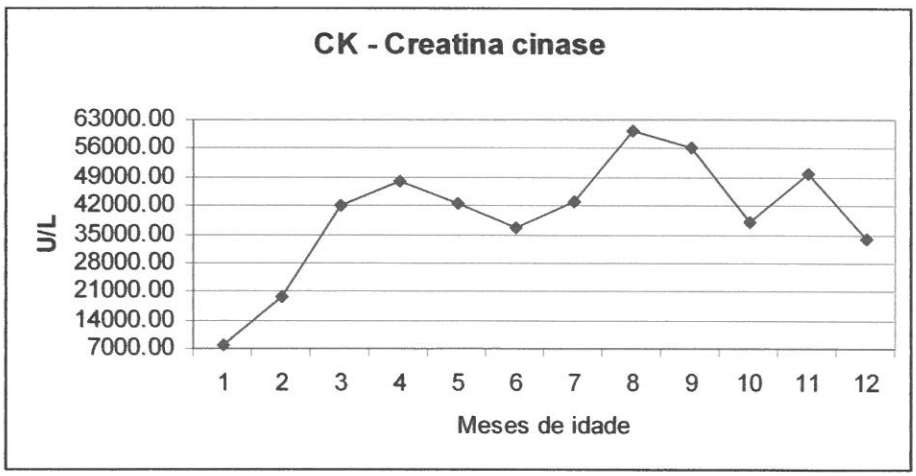

Figura 26 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de CK no soro de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em U/L.

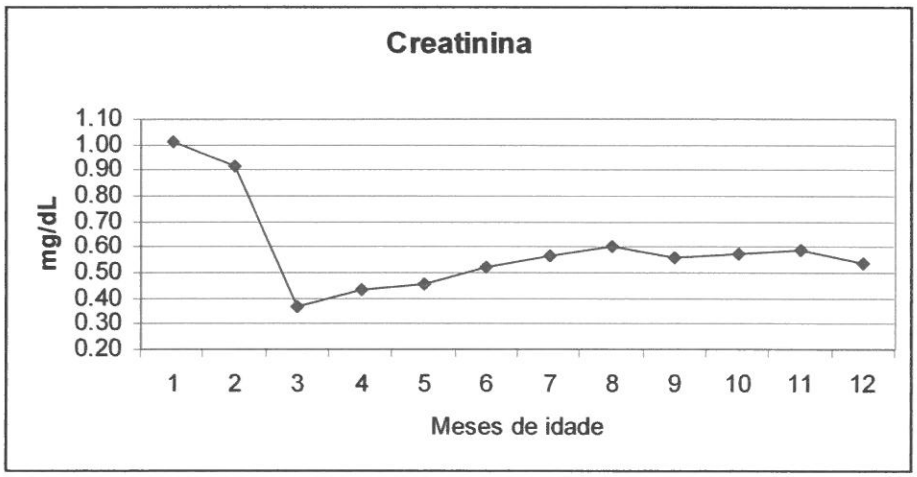

Figura 27 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de creatinina no soro de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em mg/dL

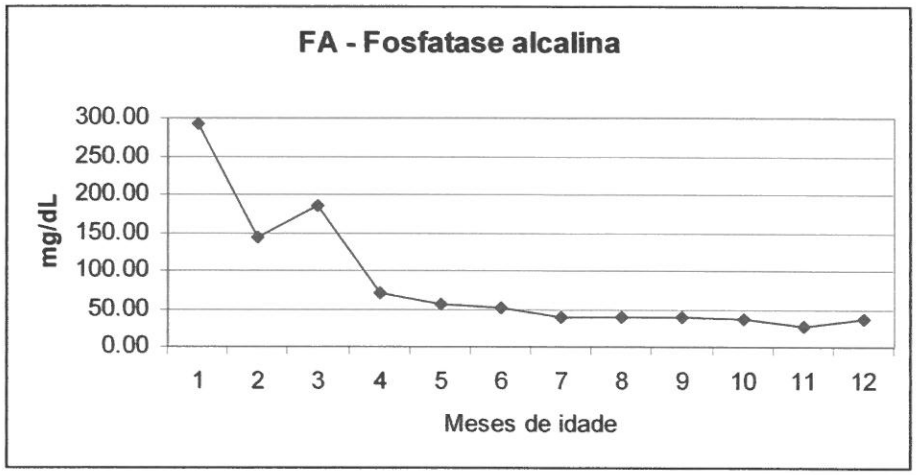

Figura 28 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de FA no soro de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em mg/dL

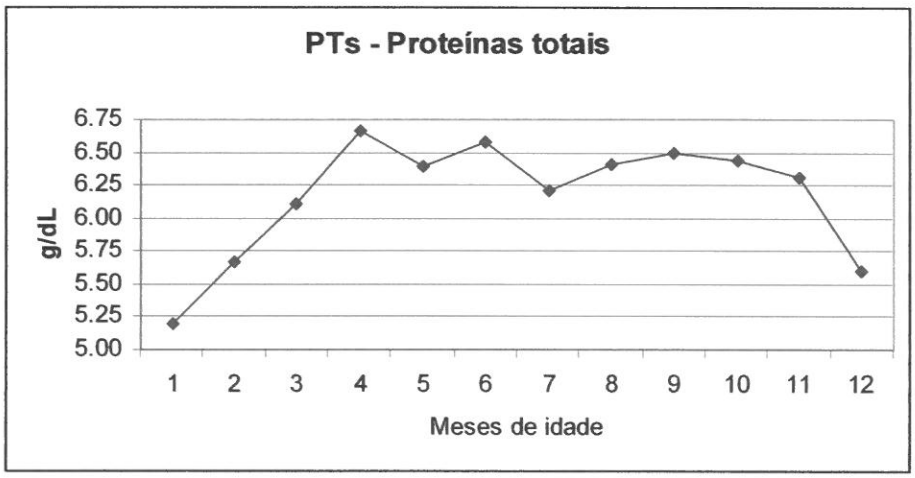

Figura 29 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de PTs no soro de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em g/dL

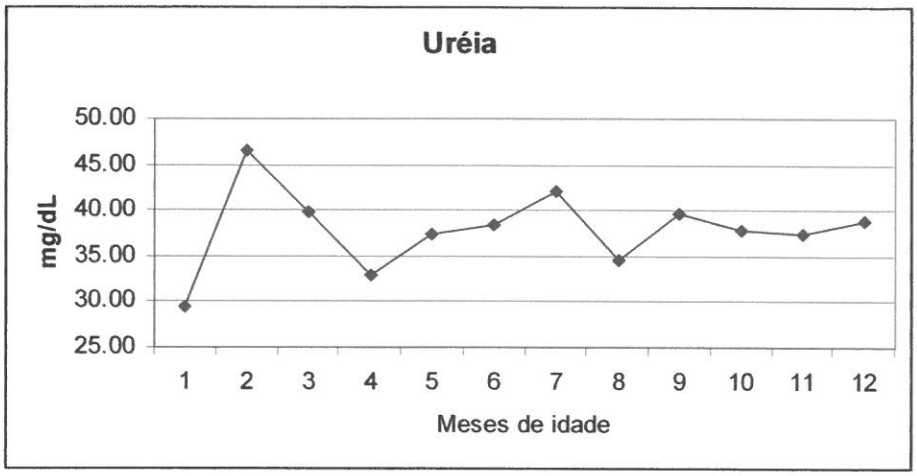

Figura 30 – Gráfico referente às médias mensais dos valores de uréia no soro de cães GRMDs de zero a 12 meses de idade. Valores em mg/dL

5.4 EXAMES DA FUNÇÃO CARDÍACA

Para avaliação cardíaca foram realizados eletrocardiograma, ecocardiograma e radiografia torácica de todos os cães envolvidos no presente estudo. Os resultados são apresentados a seguir.

5.4.1 Eletrocardiograma

As tabelas 6 e 7 indicam os valores obtidos dos eletrocardiogramas realizados nos cães distróficos aos 12 meses de idade. Cada cão foi submetido ao eletrocardiograma minutos antes da avaliação por ecocardiograma.

Tabela 6 - Resultados dos traçados eletrocardiográficos na derivação DII, velocidade 50 mm/s e 1 mV = 1 cm, dos cães GRMDs incluídos no presente estudo – São Paulo - 2008

Animal	FC	Ritmo	Eixo	Onda P	IPR
1X1	120 a 140	ARS	+30° +60°	0,05 s x até 0,2 mV	0,12 s
2L2	100 a 120	ARS	+90° +120°	0,04 s x até 0,1 mV	0,10 s
2L3	120 a 140	ARSMM	+60° +90°	0,04 s x até 0,20 mV	0,08 s
2L4	140	ARS	+60° +90°	0,04 s x até 0,25 mV	0,09 s
3H6	120	ARMM	+30° +60°	0,04 s x até 0,2 mV	0,10 s
3H10	136 a 166	ARSMM	+60° +90°	0,05 s x até 0,2 mV	0,10 s
3H12	120 a 140	ARS	+30	0,04 s x até 0,2 mV	0,10
Animal	**FC**	**Segmento ST**	**Onda T**	**IQT**	**Complexo QRS**
1X1	120 a 140	↓ de 0,10 mV	pos.>25%	0,20 s	0,06 s x 2,1 mV
2L2	100 a 120	normal	negativa	0,18 s	0,05 s x 1,2 mV
2L3	120 a 140	↓ de 0,10 mV	neg.>25%	0,20 s	0,06 s x 1 mV
2L4	140	↓ de 0,05 mV	bif.<25%	0,18 s	0,04 s x 0,8 mV
3H6	120	normal	bif.<25%	0,18 s	0,05 s x 1,4 mV
3H10	136 a 166	normal	bif.<25%	0,18 s	0,05s x 1,4 mV
3H12	120 a 140	normal	pos.<25%	0,22 s	0,04 s x 0,9 mV

Tabela 7 – Resultados dos traçados eletrocardiográficos nas derivações Pré-cordiais na velocidade 50 mm/s e 1 mV = 1 cm, dos cães GRMDs incluídos no presente estudo – São Paulo - 2008

DERIVAÇÕES PRÉ-CORDIAIS						
Animal	**CV_5RL**			**CV_6LL**		
	Onda R	Onda S	Onda T	Onda R	Onda S	Onda T
1X1	*0,9 mV*	*0,6 mV*	*positiva*	*2,3 mV*	*0,15 mV*	*positiva*
2L2	*0,6 mV*	*interferente*	*positiva*	*2,2 mV*	*interferente*	*positiva*
2L3	*0,7 mV*	*interferente*	*negativa*	*1,1 mV*	*interferente*	*negativa*
2L4	*1,8 mV*	*0,5 mV*	*positiva*	*2,5 mV*	*0,5 mV*	*positiva*
3H6	*1,3 mV*	*0,3 mV*	*positiva*	*Interferent e*	*interferente*	*positiva*
3H10	*2,2 mV*	*0,8 mV*	*positiva*	*2,7 mV*	*0,0 mV*	*positiva*
3H12	*1, 6 mV*	*0,8 mV*	*positiva*	*1,4 mV*	*0,1 mV*	*positiva*
Animal	**CV_6LU**			**V_{10}**		
	Onda R	Onda S	Onda R	Onda S	Onda R	Onda S
1X1	*2,7 mV*	*0,2 mV*	*Positiva*	*Negativa*	*negativa*	*2,7 mV*
2L2	*1,9 mV*	*interferente*	*Positiva*	*Negativa*	*Negativa*	*1,9 mV*
2L3	*0,2 mV*	*interferente*	*Negativa*	*Negativa*	*Negativa*	*0,2 mV*
2L4	*2,1 mV*	*0,1 mV*	*Positiva*	*Negativa*	*Negativa*	*2,1 mV*
3H6	*3,0 mV*	*0,0 mV*	*Positiva*	*Positiva*	*Negativa*	*3,0 mV*
3H10	*2,3 mV*	*0,0 mV*	*Positiva*	*Negativa*	*Negativa*	*2,3 mV*
3H12	*? mV*	*0,2 mV*	*positiva*	*Negativo*	*Negativa*	*? mV*

Legenda: s = segundos; mV = milivolts

Após mensuração dos valores obtidos na avaliação eletrocardiográfica foram emitidos laudos individuais para os cães, os quais estão indicados no quadro 1, abaixo.

ANIMAL	LAUDO ELETROCARDIOGRÁFICO
1X1	Ritmo sinusal normal, sugere sobrecarga de VE
2L2	Arritmia sinusal
2L3	Ritmo sinusal normal com marcapasso migratório
2L4	Ritmo sinusal normal
3H6	Arritmia sinusal com marcapasso migratório
3H12	Arritmia sinusal com marcapasso migratório - sugere sobrecarga de VE

Quadro 1 – Laudos dos traçados eletrocardiográficos dos cães GRMDs incluídos no presente estudo – São Paulo - 2008

5.4.2 Radiografia Torácica

Os laudos da avaliação da silhueta cardíaca dos cães aos 12 meses de idade estão expressos no Quadro 2, abaixo.

ANIMAL	LAUDO
1X1	Silhueta cardíaca dentro dos limites da normalidade radiográfica.
2L2	Silhueta cardíaca dentro dos limites da normalidade radiográfica.
2L3	Silhueta cardíaca dentro dos limites da normalidade radiográfica.
2L4	Silhueta cardíaca dentro dos limites da normalidade radiográfica.
3H6	Silhueta cardíaca dentro dos limites da normalidade radiográfica.
3H10	Silhueta cardíaca dentro dos limites da normalidade radiográfica.

Quadro 2 – Laudos das radiografias torácicas dos cães GRMDs avaliados neste estudo – São Paulo - 2008

5.4.3 Ecocardiograma

Os valores obtidos nos exames ecocardiográficos dos cães GRMDs estão expressos a seguir, através da tabela 8.

Houve diferença significativa entre a média dos cães distróficos (n = 6) e a média da população de cães Golden Retriever normais para os parâmetros de Peso ($p < 0.0001$) (figura 31), DVEd ($p = 0.0003$) (Figura 32), DVEs ($p = 0.0005$) (Figura 33), SIVd ($p < 0.0001$) (Figura 34), SIVs ($p = 0.0337$) (Figura 35), PVEd ($p < 0.0001$) (Figura 36), PVEs ($p < 0.0001$) (Figura 37), Ao ($p = 0.0006$) (Fgura 38), Ae (p=0.0126) (Figura 39), Ae/Ao ($p = 0.0338$) (Figura 40) e dES ($p < 0.0001$) (Figura 41).

Não houve diferença significativa entre a média dos cães distróficos (n = 6) e a média da população de cães Golden Retriever normais para a FE (p = 0.1818) (Figura 42), FS (p = 0.3255) (Figura 43).

Em relação aos volumes sanguíneos, houve diferença significativa entre a média dos cães distróficos (n = 6) e a média da população de cães Golden Retriever normais para o VOLs (p = 0.0004) (Figura 44), VOLd (p < 0.0001) (Figura 45) e Vej (p=0.0004) (Figura 46).

Não houve diferença estatística entre os grupos de fêmeas e machos distróficos para os parâmetros avaliados: peso (p = 0.8836), FC (p = 0.8178), DVEd (p = 0.9229), DVEs (p = 0.5869), SIVd (p = 0.5220), SIVs (p = 0.7208), PVEd (p = 0.2941), PVEs (p = 0.6785), Ao (p = 0.5556), Ae (p = 0.1726), Ae/Ao (p = 0.5852), FE (p = 0.1616), FS (p = 0.1596), VOLd (p = 0.5135), VOLs (p = 0.2485), Vej (p = 0.5671).

Tabela 10 – Média e desvio padrão de parâmetros ecocardiográficos de cães GRMDs incluídos no presente estudo – São Paulo, 2008

Animal	Peso	Idade	FC	DVEd	DVEs	SIVd	SIVs	PVEd	PVEs
X1	18.5	12	72.13	37.800	25.233	7.533	11.70	6.466	11.597
2L2	17.5	12	110.41	33.833	21.967	7.666	10.80	7.133	11.033
2L3	18	12	48.52	37.333	21.733	7.166	13.00	7.066	12.633
2L4	20.5	12	104.54	33.300	21.200	8.200	12.23	7.133	12.767
3H6	20.1	12	102.08	38.133	25.000	7.933	12.466	7.200	11.200
3H10	22.8	12	104.04	38.700	23.733	8.066	13.60	7.800	12.900
Média	19.56667	12	90.28667	36.517	23.14433	7.760667	12.29933	7.133	12.02167
Desvpad	1.973491	0	24.53757	2.334174	1.749912	0.382195	0.982085	0.423971	0.840673
[1] valor de referência	27.975	10.75	92.667	43.839	28.056	9.344	13.233	9.111	15.494

Animal	Ao	Ae	Ae/Ao	Des	FE	FS	VOLs	VOLd	Vej
X1	21.4	27.1	1.27	4.8	62.733	33.333	22.850	61.32	38.50
2L2	18.2	24.2	1.33		65.103	34.853	16.210	47.053	30.63
2L3	19.6	21.3	1.09	2.6	73.300	41.713	15.793	59.493	43.72
2L4	20.2	26.2	1.30	4.2	67.240	36.330	14.783	45.106	30.32
3H6	21.1	26.1	1.23	3.8	64.410	34.560	22.276	62.640	40.32
3H10	22.4	26.4	1.18	4.4	69.930	38.870	17.250	65.100	45.29
Média	20.48333	25.21667	1.233333	3.96	67.11933	36.60983	18.19367	56.78533	38.13
Desvpad	1.481103	2.147945	0.087788	0.841427	3.91819	3.138627	3.480465	8.513878	6.398325
[1] valor de referência	24.428	27.983	1.15	4.209	65.522	35.994	28.981	87.381	58.56

Notas: [1] Valores de referência_; FC= freqüência cardíaca (bpm); DVEd= diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole (mm); DVEs= diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole (mm); SIVd= espessura do septo interventricular na diástole (mm); SIVs= espessura do septo interventricular na sístole (mm); PVEd= espessura da parede do ventrículo esquerdo na diástole (mm); PVEs= espessura da parede do ventrículo esquerdo na sístole (mm); Ao= raiz da aorta (mm); AE= diâmetro do átrio esquerdo (mm); AE/Ao= relação átrio esquerdo e aorta; dES= distância entre o ponto E da valva mitral e o SIV (mm); FE= fração de ejeção (%); FS= fração de encurtamento (%); VOLs= volume na sístole (mL); VOLd= volume na diástole (mL); Vej = volume de ejeção (mL).

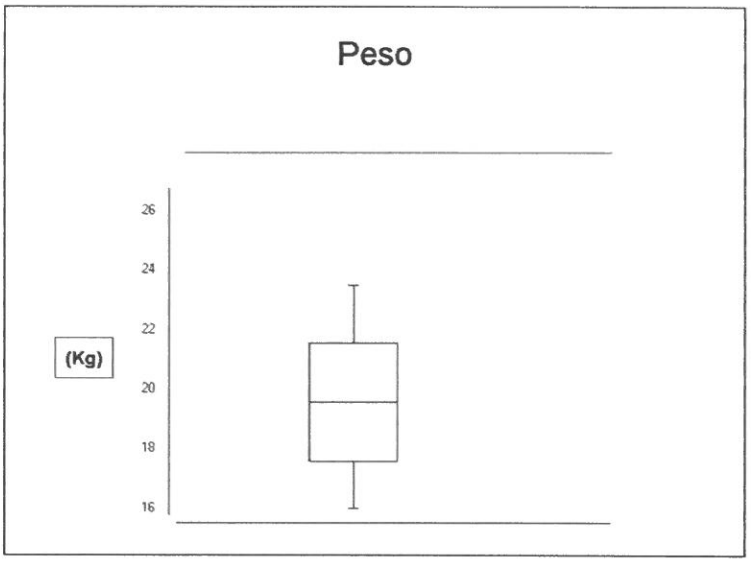

Figura 31 - Box-Plot da avaliação do parâmetro Peso, expresso em quilogramas, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média= 19,566 ± 1,973 Kg). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 27,975 Kg)

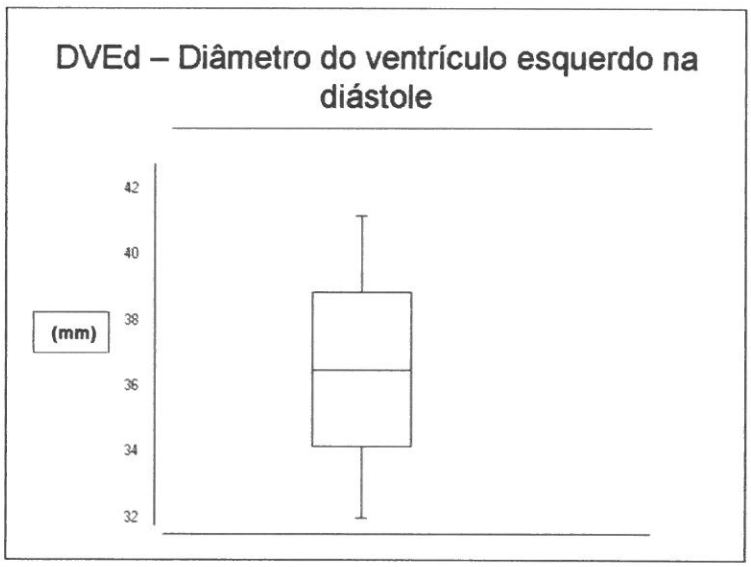

Figura 32 - Box-Plot da avaliação do parâmetro DVEd, expresso em milímetros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média= 36,516± 2,334 mm). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 43,839 mm)

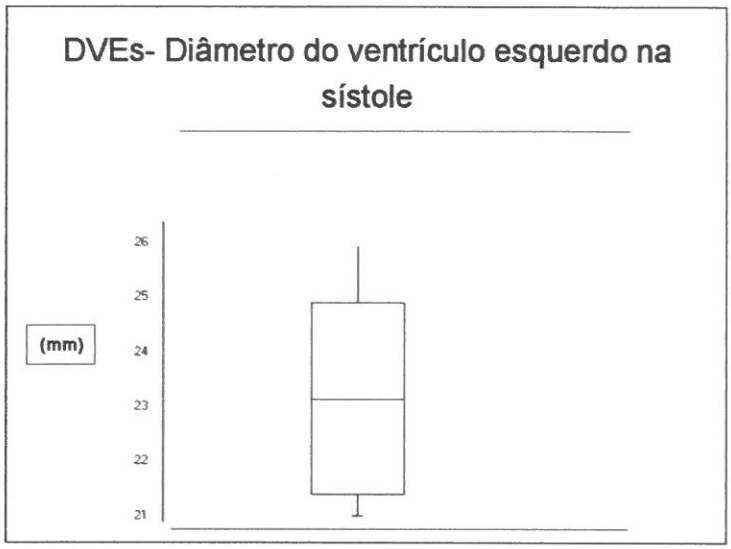

Figura 33 - Box-Plot da avaliação do parâmetro DVEs, expresso em milímetros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média= 23,144± 1,749 mm). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 28,056 mm)

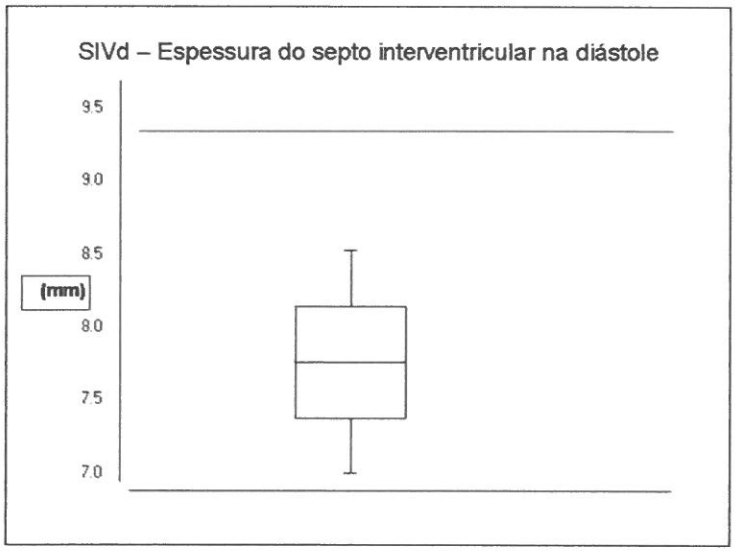

Figura 34 - Box-Plot da avaliação do parâmetro SIVd, expresso em milímetros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média = 7,761± 0,382 mm). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 9,344 mm)

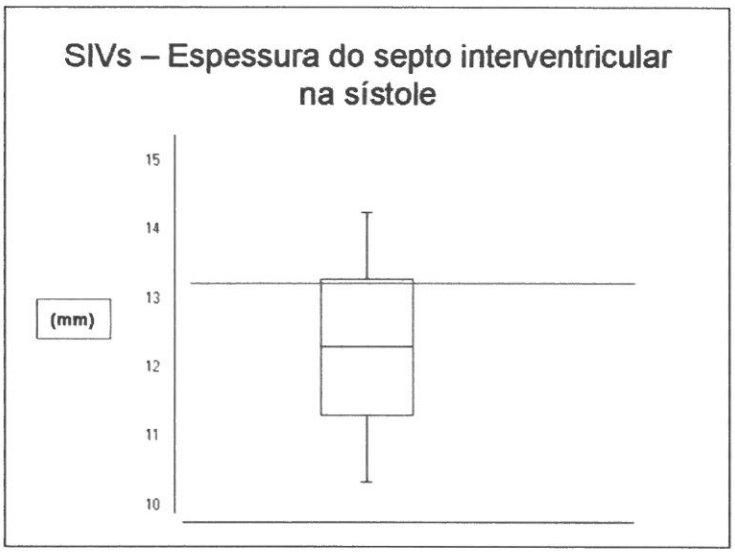

Figura 35 - Box-Plot da avaliação do parâmetro SIVs, expresso em milímetros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média= 12,299± 0,982 mm). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 13.233 mm)

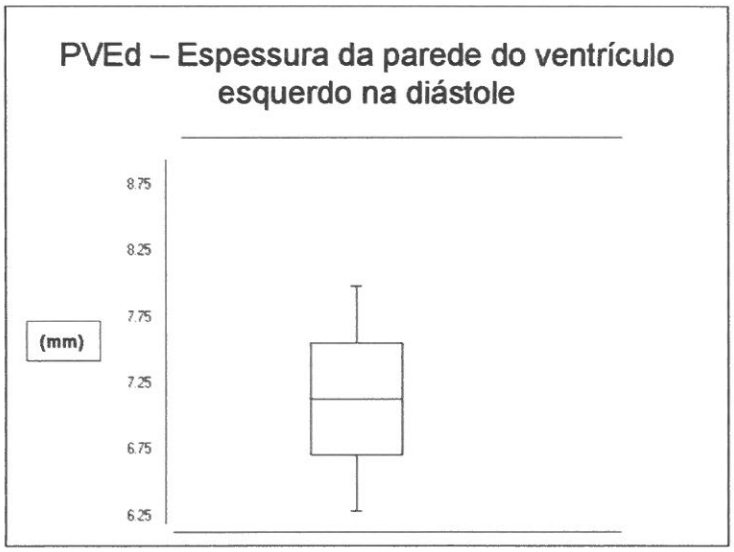

Figura 36 - Box-Plot da avaliação do parâmetro PVEd, expresso em milímetros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média= 7,133± 0,423 mm). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 9,111 mm)

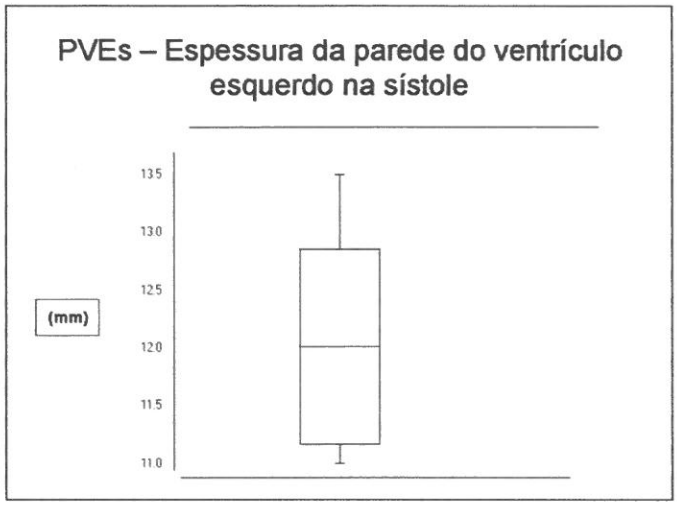

Figura 37 - Box-Plot da avaliação do parâmetro PVEs, expresso em milímetros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média = 12, 021±0, 840 mm). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média = 15,494 mm)

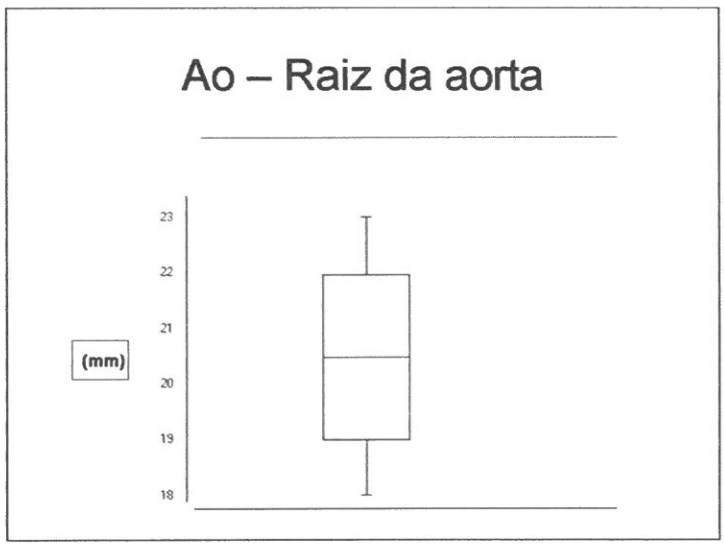

Figura 38 - Box-Plot da avaliação do parâmetro Ao, expresso em milímetros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média= 20,483 ± 1,481 mm). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 24,428 mm)

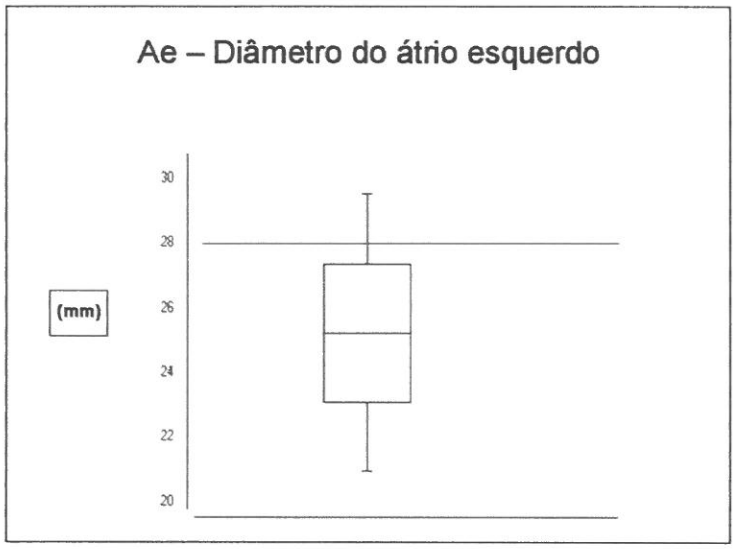

Figura 39 - Box-Plot da avaliação do parâmetro Ae, expresso em milímetros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média = 25,216 ± 2,147 mm). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 27,983 mm)

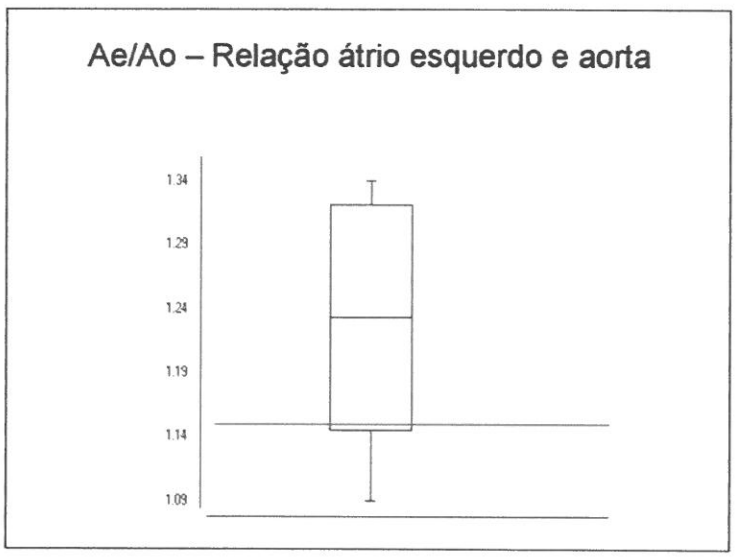

Figura 40 - Box-Plot da avaliação do parâmetro Ae/Ao dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média = 1,233 ± 0,087). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 1,15)

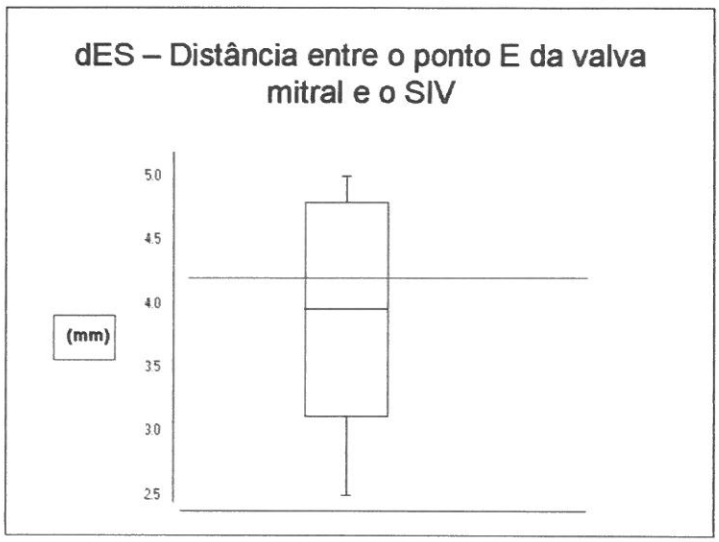

Figura 41 - Box-Plot da avaliação do parâmetro dES, expresso em milímetros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média = 3,960 ± 0,841 mm). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média = 4,209 mm)

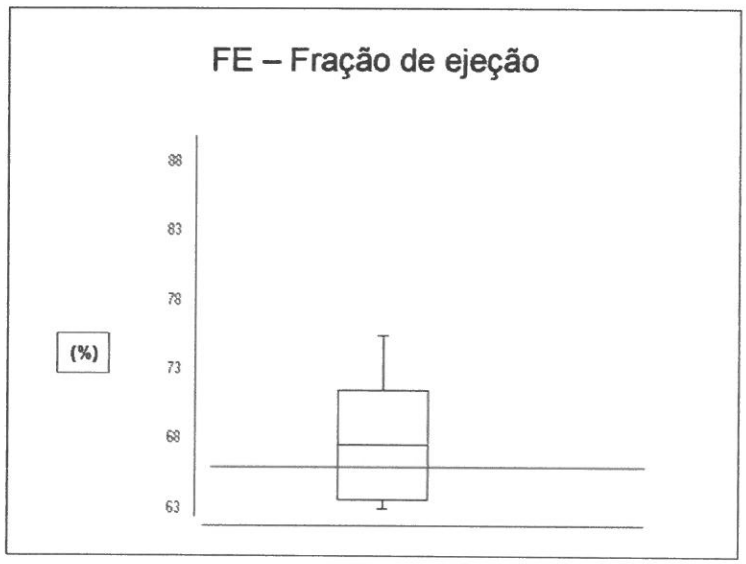

Figura 42 - Box-Plot da avaliação do parâmetro FE, expresso em porcentagem, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média = 67,119 ± 3,918%). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média = 65,522 %)

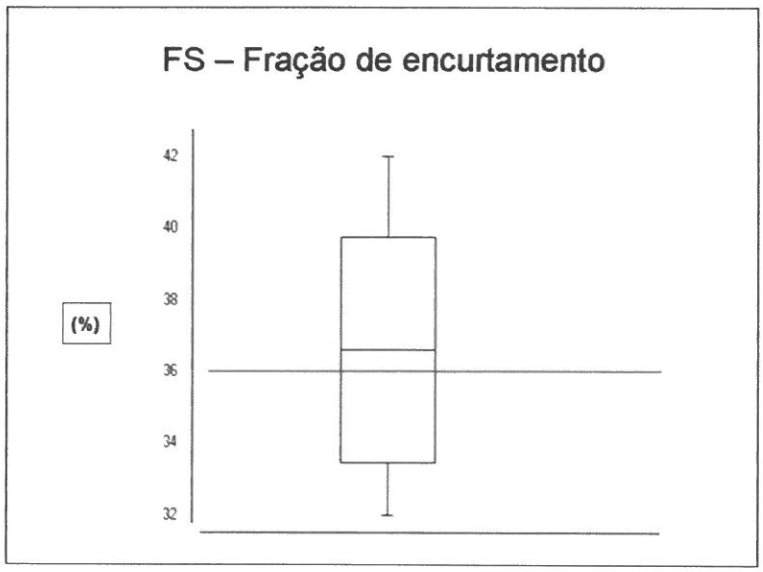

Figura 43 - Box-Plot da avaliação do parâmetro FS, expresso em porcentagem, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média = 36,609 ± 3,138 %). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média = 35,994 %)

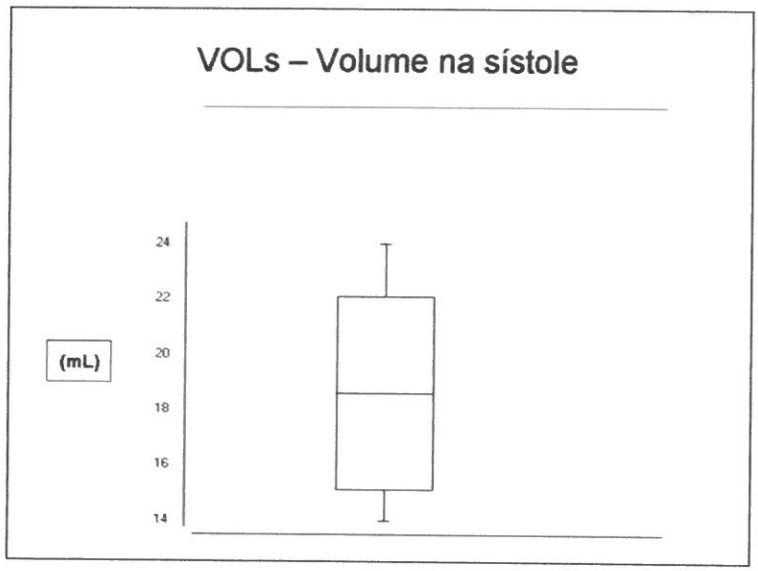

Figura 44 - Box-Plot da avaliação do parâmetro VOLs. expresso em mililitros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média = 18,193 ± 3,480 mL). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média= 28,981 mL)

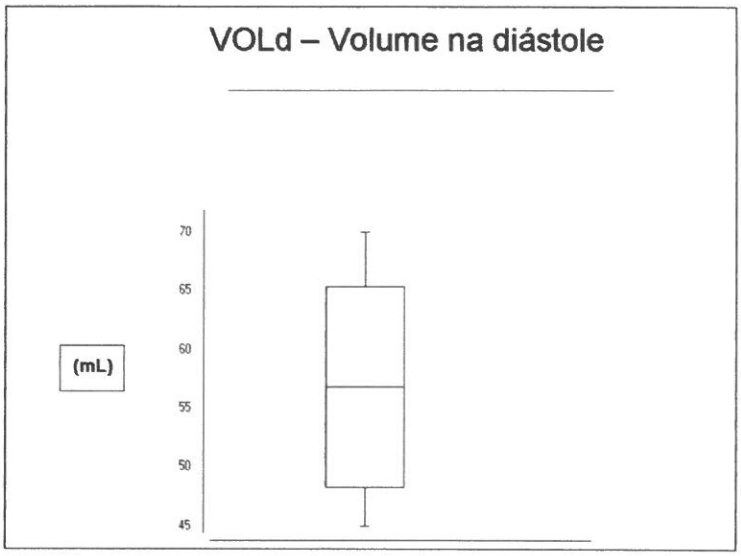

Figura 45 - Box-Plot da avaliação do parâmetro VOLd, expresso em mililitros, dos cães GRMDs avaliados aos 12 meses de idade (média = 56,785 ± 8,513 mL). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média = 87,381 mL)

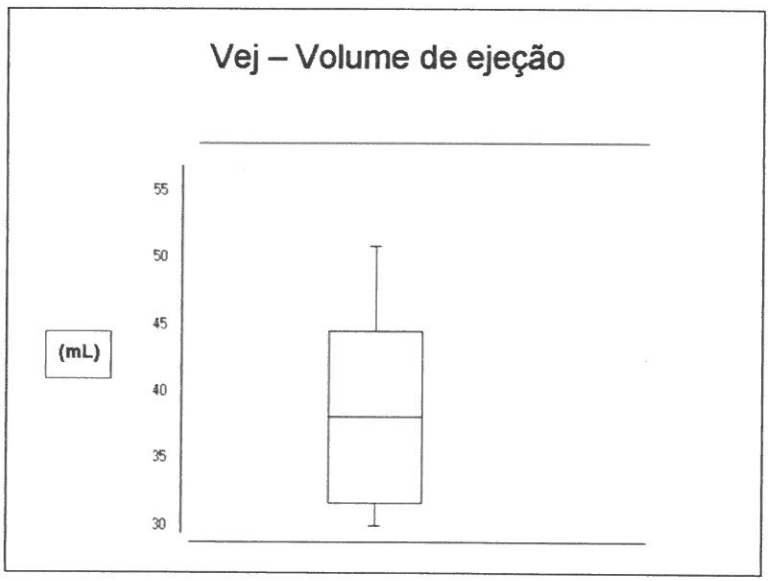

Figura 46 - Box-Plot da avaliação do parâmetro Vej, expresso em mililitros, dos cães GRMDs avaliados (média = 18,193 ± 3,480 mL). A linha azul indica o valor de referência em Goldens normais (média = 28,981 mL)

6 DISCUSSÃO

Para melhor entendimento os resultados obtidos estão divididos e discutidos em tópicos, expostos a seguir.

6.1 AVALIAÇÃO DO APARELHO LOCOMOTOR

A realização de acompanhamento clínico mensal durante 12 meses dos animais avaliados permite afirmar que cães de uma mesma ninhada, tratados de forma semelhante, podem apresentar fenótipos muito desiguais entre si, assim como o ritmo e características da patologia também se manifestam de maneira diferente em cada animal.

De acordo com o relatado por Howell et al. (1997), ao longo de 12 meses, observaram-se alterações no padrão de marcha, postura quadrúpede, lentidão nas mudanças de postura e fraqueza muscular em diferentes graus para cada um dos animais. Durante o primeiro ano de vida a marcha destes animais torna-se cada vez mais difícil e com maior gasto de energia.

Após análise dos resultados da avaliação de Amplitude do Movimento Articular nos cães envolvidos, constatou-se que durante o desenvolvimento da distrofia muscular, as quatro articulações avaliadas, carpo, cotovelo, joelho e tarso, têm manifestações diferentes, sugerindo adaptações articulares e periarticulares nos animais distróficos.

Gaiad (2006) estudou a influência da fisioterapia na função motora e histopatologia das fibras musculares em cães GRMDs. Foram encontrados os seguintes valores médios para as ADM das quatro articulações avaliadas em 14 cães Golden Retriever adultos normais, utilizados como grupo controle em seu estudo: articulação do carpo: 131,42°, articulação do cotovelo: 119,82°, 1 articulação do joelho 15,89 ° e 123,57° para articulação do tarso.

Assim como constatado por Gaiad (2006), os valores obtidos para articulação do carpo em nossos animais indicaram valores acima daqueles encontrados para goldens normais, sugerindo uma hiperextensão dessa articulação em GRMDs. Em contrapartida, a autora observou valores de ADM de tarso e joelho diminuídos em GRMDs adultos quando comparados aos valores de cães normais, sugerindo uma limitação do movimento causada por encurtamento muscular devido ao acúmulo de tecido conjuntivo característico da doença.

Esse achado não se repetiu no presente estudo, uma vez que os valores médios para ADM de tarso e joelho dos GRMDs aos 12 meses de idade encontram-se na média do grupo controle, ou acima dela.

Jaegger, Marcellin-Little e Levine (2002) realizaram estudo semelhante com 16 cães adultos sadios da raça Retriever do Labrador, obtendo os seguintes valores médios de angulação: articulação do carpo de 164°, articulação do cotovelo de 129°, articulação do joelho 120°, e articulação do tarso: 128°. Apesar de serem cães de raças diferentes, Labradores e Goldens são cães de porte e características muito semelhantes, portanto os valores encontrados por estes autores são válidos para efeitos de comparação.

As discrepâncias observadas nos valores da ADM podem ser explicadas pelas diferenças de fenótipos, idade e sexo dos cães GRMDs avaliados pela autora e no presente estudo.

Kornegay et al. (1994) avaliaram 13 cães GRMDs em faixa etária próxima à do nosso estudo, aos três e seis meses de idade. Eles notaram uma diminuição significativa da ADM do tarso durante o tempo de avaliação (média da articulação do tarso: 117,6 ° ± 24,55 aos seis meses). De acordo com os autores, contraturas articulares em GRMDs alteram a conformação restringindo a marcha progressivamente, principalmente entre três e seis meses de idade. Os autores ainda sugerem que a mensuração da ADM do tarso pode ter uma função de prognóstico da evolução da distrofia muscular, elucidando as diferenças fenotípicas desses animais.

Algumas pesquisas indicam uma relação proporcional entre aumento da idade do cão e diminuição da ADM do tarso (KORNEGAY et al, 1999); porém fato inverso ocorreu na presente avaliação, pois os valores da ADM do tarso aumentaram até os 12 meses de idade. Infelizmente, não existem dados na literatura referentes à mesma avaliação em GRMDs de outras faixas etárias.

6.2 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA

Atualmente várias pesquisas envolvendo o modelo canino da distrofia muscular estão em andamento, porém não há muitos trabalhos referentes aos aspectos reprodutivos desses animais.

Existem poucos canis experimentais com cães GRMD. Os animais distróficos necessitam de manejo cuidadoso e específico, entretanto poucos são os estudos desenvolvidos para padronizar os cuidados com estes animais. O manejo reprodutivo é extremamente importante para qualquer criação e necessita de atenção redobrada quando modelos experimentais estão envolvidos.

6.2.1 Avaliação Andrológica

Shimatsu et al. (2003) avaliaram a capacidade de fertilização de sêmen congelado de cães GRMDs, mediante inseminação artificial em 10 cadelas da raça beagle, obtendo ótimos resultados, uma vez que das 10 fêmeas inseminadas, por via vaginal, 8 geraram ninhadas com média de 5 a 6 filhotes cada, porém este estudo não descreveu as características do sêmen utilizado.

De acordo com Luppi (2006), diversas alterações clínico-reprodutivas podem influenciar negativamente a capacidade reprodutiva de um cão afetado pela distrofia muscular, dentre elas destacam-se: criptorquidismo, alta porcentagem de defeitos espermáticos maiores e totais na avaliação da morfologia espermática e degeneração testicular.

Macroscopicamente, a segunda fração dos ejaculados apresentou uma coloração branca opalescente e viscosidade leitosa, consideradas normais para cães.

Para Sorribas (2006) a média de volume da segunda fração do ejaculado canino é de 0,6 mL (média de 0,4 a 2 mL), já Vannucchi, Satzinger e

Santos (1998) consideram que a 2ª fração, rica em espermatozóides, tem um volume que varia de 1 a 3 mL. Os volumes obtidos em nossas coletas estão dentro dos intervalos considerados por estes autores.

O cão 2L2 apresentou aspermia e ausência de libido nas duas coletas realizadas, aos 9 e 12 meses de idade. Classificamos o animal num quadro de impotência *coeundi*.

Relacionamos essa ausência de libido à pouca idade do animal, principalmente na época da primeira tentativa, e também ao fator "território desconhecido", pois a área de localização do canil GRMD-Brasil é afastada dos outros setores da FMVZ-USP; as coletas e avaliações seminais foram realizadas no laboratório de reprodução animal, dentro do hospital veterinário, ou seja, um local totalmente desconhecido para o cão.

O cão 2L7 também apresentou aspermia aos 9 meses de idade; podemos associar sua falta de libido aos mesmos fatores citados para o cão 2L2, porém neste caso é preciso ressaltar que o cão 2L7 apresentava quadro bastante evoluído da doença, com comprometimento muscular evidente, e acabou indo a óbito antes da 2ª coleta seminal.

Os cães 2L3 e 3H10 ejacularam e tiveram seu sêmen avaliado.

Vogler et al. (1991) afirmam que alta temperatura testicular propicia degeneração e atrofia nos testículos, apesar de esta condição patológica ser multifatorial, pois envolve indiretamente outros distúrbios, como quadros febris e toxêmicos, fatores endócrinos e nutricionais, como subnutrição (SILVA et al., 2002) e estresse (YIN et al., 1997). Cães distróficos apresentam distúrbios metabólicos importantes, decorrentes da doença, e, como conseqüência, desenvolvem condições corporais inferiores às de animais normais. Muitos

cães afetados apresentam megaesôfago e projeção do estômago para a cavidade torácica, em função da fragilidade diafragmática, ocasionando quadros recorrentes de refluxo e gastrite crônica; conseqüentemente, alterando a absorção de nutrientes, uma vez que alguns cães em fase adiantada da doença apresentam anemia. Tais intercorrências também podem estar associadas a distúrbios reprodutivos e até mesmo contribuir para a degeneração testicular.

Luppi (2006) relata que cães afetados pela distrofia muscular apresentam importantes alterações clínico-reprodutivas, como criptorquidismo, hérnia inguinoscrotal, e exposição constante de glande peniana na ausência de ereção.

Os cães avaliados não apresentaram alterações como criptorquidismo ou hérnia inguino-escrotal, no entanto em determinados dias é possível observar exposição da glande sem presença de ereção.

A autora também afirma que os cães distróficos apresentam maior taxa de anormalidade espermática (defeitos maiores e menores), degeneração testicular e fibrose, hialinização e retração de fibras musculares do músculo cremaster. Tais achados são condizentes com os valores obtidos na avaliação seminal dos cães 2L3 e 3H10, que apresentaram alta porcentagem de anormalidade espermática nas primeiras avaliações seminais. Porém, motilidade, vigor espermático e concentração espermática nos dois cães avaliados foram menores que a média dos cães distróficos avaliados por Luppi (2006) em seu experimento.

De acordo com Bogan, 2006 (informação verbal)[3], cães distróficos da colônia da Universidade do Missouri também apresentam alta porcentagem de defeitos espermáticos, atribuída em parte às escoriações escrotais pelos constantes traumas locais em função da alteração da marcha devido à rigidez dos membros pélvicos. O processo inflamatório local aumenta a temperatura escrotal e contribui a acentuar o processo de degeneração testicular. É importante ressaltar que não foram observadas lesões semelhantes nos cães utilizados no presente estudo, porém alguns machos mais velhos do mesmo canil manifestaram lesões parecidas.

6.2.2 Avaliação Ginecológica

Todas as fêmeas distróficas que permaneceram vivas até completarem 12 meses de idade apresentaram maturidade sexual, pois manifestaram as quatro fases do ciclo estral (anestro, proestro, estro e diestro) bem explicitamente.

As cadelas apresentaram estro aos 9 meses de idade, época em que começaram a parar de crescer e manter seu peso constante.

A literatura existente sobre fêmeas caninas com distrofia muscular é muito escassa, praticamente inexistente; Shelton et al. (2001) estudaram cinco cadelas com desordens neuromusculares consistentes com distrofia muscular,

---

[3] Informação fornecida por Janet Bogan, em 2006, em São Paulo.

porém os autores não realizaram nenhuma avaliação reprodutiva nesses animais.

A necessidade por mais avaliações sobre fêmeas distróficas é evidente; Klarenbeek et al. (2007) relataram o primeiro aparecimento de distrofia muscular canina em cães da raça "Grand Basset Griffon Vendéen", ou Grande Basset Griffon da Vendéia, em dois machos e uma fêmea. Os autores enalteceram o fato de participarem de um dos poucos relatos de caso de distrofia em fêmeas caninas, porém , em seu estudo, realizaram necropsia dos três cães próximos dos dois meses de idade, não sendo possível nenhuma observação a respeito da função reprodutiva desses animais.

Atualmente, as cadelas 1X1 e 3H6 estão com 28 meses de idade e apresentam ciclos estrais regulares na mesma época que as outras fêmeas portadoras do canil, a cada seis meses.

6.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

6.3.1 Hemograma

De acordo com Harper et al (2003), os valores de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito dos cães tendem a aumentar durante os doze primeiros meses de vida, alcançando um "platô" após o primeiro ano de idade. Também constatamos esta tendência nos cães jovens GRMD avaliados, porém alguns valores médios obtidos em nosso trabalho

estiveram abaixo dos valores para cães saudáveis de mesma idade usados como referências para este trabalho. (ver tabelas 11 e 12 nos apêndices A e B).

Lund et al. (2000) avaliaram amostras sangüíneas de filhotes clinicamente saudáveis das raças Beagle, Pastor Alemão e Golden Retriever entre 01 e 58 dias pós-nascimento, e concluíram que a concentração de hemoglobina aumenta com o crescimento dos animais, ao passo que a contagem de células brancas atinge valores mais baixos na classe adulta. Também observamos uma diminuição no número total de leucócitos nos animais próximos aos 12 meses de idade.

Uchiyama et al. (1985) avaliaram cães da raça Beagle, de ambos os sexos, entre 01 e 121 meses de idade, e também observaram que os valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito aumentam com o crescimento do filhote. Os autores relatam, porém, que o índice VCM decresce gradualmente com a idade; em nosso trabalho observou-se o oposto, os valores aumentaram conforme os cães ficavam mais velhos. Os mesmos autores observaram efeito oposto para o índice CHCM, que aumentou gradualmente com o passar dos meses; mas não foram observados aumentos consideráveis na avaliação dos GRMDs. Durante os três primeiros meses de vida, a maioria dos parâmetros hematológicos avaliados esteve dentro dos valores considerados para cães normais, com exceção das médias de leucócitos e plaquetas, que estiveram acima dos intervalos considerados normais. O estado de trombocitose apresentado por esses animais pode ser associado a um quadro chamado de "trombocitose secundária", que está ligada a várias doenças inflamatórias crônicas (MEYER; HARVEY, 1998). Durante a fase entre três e seis meses de

idade, a média para He foi menor que as médias esperadas para cães saudáveis. Todos os demais parâmetros avaliados nesta fase puderam ser considerados normais. Já durante a fase entre seis e doze meses, valores de He, Hb, Ht e neutrófilos segmentados estiveram abaixo do esperado, enquanto que VCM, HCM, CHCM, leucócitos, eosinófilos e monócitos estavam normais. O valor obtido para linfócitos foi maior que os valores para cães saudáveis. Valores elevados de leucócitos até duas vezes maiores que os limites de referência para adultos podem ser considerados normais, principalmente em filhotes muito novos e lactentes (UCHIYAMA et al 1985; MEYER e HARVEY, 1998); fato que pôde ser constatado durante o presente estudo.

A interpretação de resultados de testes hematológicos para filhotes com menos de um ano de idade deve ser realizada com cuidado para não interpretar erroneamente os valores acusados e, assim, não classificar como anêmico um filhote saudável apenas porque se valeram de referências para adultos .

Também é preciso considerar que existem diferenças raciais importantes, como porte e comportamento, por exemplo Seria ideal, portanto, a padronização dos parâmetros hematológicos para as principais raças de cães existentes; isso facilitaria a interpretação e tratamento de clínicos na rotina hospitalar bem como o andamento de pesquisas científicas com cães de laboratório.

As principais alterações observadas referem-se aos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito diminuídos em cães próximos aos 12 meses de idade, porém estes valores não se refletiram em alterações clínicas relevantes, e são necessárias mais investigações para comprovar a causa

dessas alterações. Suspeita-se que esses valores tenham ligação com uma provável deficiência na absorção dos nutrientes ingeridos. .

6.3.2 Bioquímica Sérica

Creatina cinase (CK) é uma enzima intracitoplasmática, a qual é liberada de células lesadas (VALENTINE et al 1990). Estudos indicam claramente que CK é encontrada primariamente em musculatura esquelética, cardíaca e lisa.

A atividade de creatina cinase está aumentada no soro de pacientes com distrofias musculares, especialmente aqueles com distrofia muscular de Duchenne (DMD); sendo assim, já eram esperados os valores extremamente elevados obtidos em nosso trabalho. Este aumento sorológico tem sido atribuído ao aumento de creatina cinase liberada de fibras musculares de modelos de isoformas da enzima. O aumento de CK é especulado como resultado de escape da enzima de fibras musculares doentes. Entretanto, o mecanismo de fuga desta enzima não é conhecido (OZAWA, 1999).

A atividade enzimática em cães sadios com menos de seis meses de idade é o dobro daquela observada nos adultos. A partir dos três meses de idade os animais apresentaram valores de CK ainda mais altos do que os já muito elevados valores ao nascimento. Isso se explica pelo fato de que, a partir dos três meses, os cães entram numa fase de desenvolvimento chamada "período juvenil", que se estende até completarem doze meses de vida, ou atingirem maturidade sexual. No período juvenil o crescimento e o

desenvolvimento dos animais ocorrem em maior intensidade, por isso justifica-se a intensa atividade muscular com conseqüente necrose e aumento na mensuração de CK.

Yugeta et al. (2006) examinaram o perfil clínico de oito cães distróficos com idades de dois a vinte e um meses, e dosaram valores séricos de CK entre 12.500 e 138.000 U/L. Tais valores foram significativamente diferentes dos valores mensurados nos cães controles do referido experimento, onde a CK oscilou entre 60 e 515 U/L.

Em cães normais, machos são reconhecidos por apresentarem atividades plasmáticas de CK 50% maiores que fêmeas. Essa relação não foi observada nas análises do presente estudo, pois muitas vezes o valor apresentado por uma fêmea GRMD foi maior que o dosado num macho em mesma condição e idade. Suspeita-se que isto ocorra devido ao fato de que existem muitas variações fenotípicas e genotípicas entre os animais afetados pela GRMD, e assim cada cão, mesmo dentro de um grupo homogêneo, manifesta-se clinicamente diferente um do outro.

Alanina aminotransferase (ALT), assim como a creatina cinase, também é uma enzima intracitoplasmática, ou seja, também é liberada quando ocorre lesão celular. A atividade de ALT é mais alta no fígado, mas cerca de 5,3 – 7,7% do que é encontrado neste órgão está presente em músculo esquelético, assim, podemos suspeitar que os valores extremamente altos desta enzima dosados em nossos cães estão relacionados tanto às lesões musculares como aos problemas hepáticos observados nas distrofias musculares. Em crianças com DMD, aumentos na atividade sorológica de ALT são comuns; e estes

aumentos também estão associados à distrofia muscular nutricional induzida experimentalmente em cordeiros (VALENTINE et al., 1990).

Não se pode descartar a hipótese de que o sarcolema de cães distróficos seja anormalmente "frouxo", permitindo a liberação ou "escape" de enzimas sem franca necrose. Alternativamente, um aumento suficiente de ALT que exceda concentrações normais de ALT pode estar associado a uma lesão severa incomum e / ou contínua da fibra muscular.

De acordo com Bush (2004), a ALT não possui isoenzimas especificas, e suas concentrações no coração e nos rins são equivalentes, respectivamente, a um quarto e a um décimo das concentrações hepáticas da enzima. Desta forma, pode-se argumentar que o aumento da atividade desta enzima em cães distróficos é devido a um prejuízo do miocárdio e não apenas à degeneração da musculatura esquelética (KELLER, 1981). Considera-se este argumento improvável, já que lesões histológicas não estão presentes no coração de cães distróficos com menos de doze semanas idade (VALENTINE, et al., 1988); e os achados deste trabalho indicam atividade de ALT claramente aumentada desde o primeiro mês de vida dos filhotes GRMD avaliados.

Os dados deste estudo são semelhantes aos de Harper et al. (2003), que avaliando variações hematológicas e bioquímicas plasmáticas relacionadas à idade em cães, não encontraram variâncias significativas relacionadas à idade para as enzimas ALT e AST, nem para a uréia.

O aumento plasmático da fosfatase alcalina (FA) é resultado do aumento da síntese desta enzima, e não da sua liberação a partir de células lesadas. Atividades isoladas de fosfatase alcalina em animais jovens são resultado da origem óssea desta enzima, refletindo a atividade óssea de osteoblastos.

Atividades plasmáticas desta isoenzima decrescem com a proximidade da maturidade e fechamento das epífises (BUSH, 2004). Assim, atividades de FA alcalina são significativamente maiores em cães com menos de um ano de idade que em cães mais velhos. Tais informações são consistentes com o presente estudo, que indicou que as dosagens de FA encontradas nos primeiros meses de vida são muito maiores que os valores de referência para adultos. Estes dados combinam com observações prévias demonstradas por outros autores, como Harper (2003).

Há relatos de que a prescrição da dieta Hill's S/D em cães possa causar aumento da atividade sérica de FA (BUSH, 2004) - ração oferecida aos animais do canil GRMD - porém não foram realizados estudos mais aprofundados para confirmar a influência da dieta nas dosagens da referida enzima.

A uréia também foi avaliada neste estudo e não houve evidência de que as concentrações de uréia plasmática aumentam significativamente com o avançar da idade em cães. Foram observados ligeiros aumentos nos resultados obtidos, os quais não podem ser diretamente relacionados às conseqüências da distrofia muscular; pois os valores encontrados são compatíveis com aumentos na concentração deste metabólito em animais normais com algum tipo de azotemia (pré-renal, renal ou pós-renal) (BUSH, 2004).

Exemplificando, ocorre aumento na taxa de catabolismo protéico quando cães ingerem dieta com alto valor protéico. Isto ocorre com os animais do canil GRMD Brasil, que, como foi relatado anteriormente, são alimentados com dieta Hill's S/D; deve-se considerar, além disso, a diminuição da perfusão renal,

que ocorre em casos de desidratação, muito comuns em cães distróficos devido à disfagia que apresentam.

Níveis plasmáticos de creatinina também foram avaliados no presente estudo, porém não observamos alterações relevantes referentes a este metabólito, relacionando-o diretamente com a distrofia muscular do cão golden retriever (GRMD).

Assim como na avaliação hematológica, seria interessante uma padronização de valores de referência para parâmetros bioquímicos (enzimas e proteínas) para as principais raças de cães existentes, pois é preciso considerar algumas diferenças entre raças que podem influenciar na mensuração e avaliação desses parâmetros, como exemplo, porte, comportamento e manejo alimentar.

6.4 AVALIAÇÃO CARDÍACA

Henik et al. (1995) relatam que o ecocardiograma Modo M é um exame sensível para detectar aumentos no ventrículo direito, especialmente em casos de dirofilariose; por isso é muito importante o conhecimento dos valores normais de referência das dimensões internas do ventrículo direito na diástole.

Em relação ao diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole e sístole, a importância do estabelecimento desses padrões relaciona-se ao diagnóstico não invasivo de várias doenças, inclusive as cardiomiopatias congestivas, que alteram significantemente essas medidas.

AE e AO são medidas bastante relevantes, pois sua relação (AE/AO) é um guia prático para detectar aumentos no átrio esquerdo, observados em fase inicial de processo patológico, e, algumas vezes, passam despercebidos por outros exames complementares, como radiografias e ecocardiografias, por exemplo, como relatado por Boon et al. (1983).

Snyder et al. (1995) observaram em cães da raça Greyhound uma hipertrofia do septo interventricular na diástole e na sístole, cujos resultados são superiores aos encontrados nos GRMDs do presente estudo e em cães normais da raças Pastor Alemão e Golden Retriever (MUZZI et al., 2000; PELLEGRINO et al., 2007, respectivamente); e citaram como explicação uma possível variação genética dessa raça em relação às demais. O mesmo foi observado em relação aos valores de espessura da parede posterior do VE em diástole e sístole.

Outra variável estudada foi a relação entre espessura do septo interventricular e parede do ventrículo esquerdo, ambas na diástole (SIVd/PVEd), cujo valor foi bem próximo ao encontrado por Boon et al. (1983) e Muzzi et al. (2000) em seus respectivos estudos. Relata-se que na cardiomiopatia hipertrófica essa relação é freqüentemente superior a 1,3, indicando que o septo é geralmente mais afetado que a parede do VE, reforçando a importância de se conhecer os valores normais dessa variável (MUZZI et al.; 2000).

De acordo com Boon et al. (1983), a porcentagem de encurtamento sistólico do diâmetro do VE, denominado no presente estudo por "fração de encurtamento", faz parte dos chamados índices de função ventricular esquerda. Este é um índice preciso da contratilidade e da complacência ventricular

esquerda, clinicamente útil para detectar alterações em uma ampla variedade de raças, pesos corporais e idade, pois não tem correlação significativa com tais itens. Valores para esse índice foram determinados para vários cães já estudados, e podem ser até 30 a 40% maiores, dependendo da raça avaliada. Uma possível explicação para tamanha diferença está baseada no porte do animal, como observado por Snyder et al. (1995) quando avaliaram cães da raça Greyhound. O valor médio encontrado para fração de encurtamento nos cães GRMDs esteve bem próximo dos valores obtidos por Hanton et al. (1998) em beagles, Muzzi et al. (2000) em pastores alemães e por Pellegrino et al. (2007) em goldens retrievers normais.

Apesar de os parâmetros cardíacos avaliados nos animais distróficos terem sido significantemente diferentes dos parâmetros encontrados em cães sadios normais, pode-se inferir que não se observa deficit na fisiologia cardíaca dos distróficos.

Tal inferência baseia-se na relação positiva entre o peso dos animais e os parâmetros cardiológicos, sendo que, deste modo, quanto menor o peso do animal menor será o seu esforço cardíaco e, portanto, as estimativas dos parâmetros ecocardiográficos serão relativamente menores.

Clinicamente os animais distróficos não apresentaram alterações fisiológicas cardíacas significativas devido aos seus parâmetros ecocardiográficos menores encontrados, uma vez que os cães afetados comportaram-se similarmente aos animais normais, quando avaliados na faixa etária dos 12 meses de idade. Porém, estudos recentes envolvendo cães distróficos sugerem que a avaliação cardíaca por Tissue Doppler nestes animais pode ser útil para detecção precoce de cardiomiopatia dilatada,

quando achados de exame clínico cardiovascular, radiografia torácica e avaliação ecocardiográfica ainda estão dentro dos limites de referência, e as dimensões do VE e função ainda estão preservadas em cães distróficos (CHETBOUL et al., 2004a;b).

7 CONCLUSÕES

Em relação à avaliação do Aparelho Locomotor, os dados obtidos durante avaliação da amplitude do movimento articular passiva (ADM) do cotovelo, carpo, joelho e tarso, associados à avaliação postural quanto à simetria e alterações articulares, sugerem que as alterações observadas estão relacionadas às adaptações mecânicas da musculatura esquelética decorrentes da distrofia muscular, com discretas limitações de ADM passiva.

Quanto aos aspectos reprodutivos, na questão da avaliação andrológica, os cães afetados pela distrofia muscular avaliados neste experimento apresentaram maiores taxas de anormalidade espermática (defeitos maiores e menores) aos 12 meses de idade.

A distrofia muscular do cão Golden Retriever pode afetar a aptidão reprodutiva de alguns cães aos 12 meses de idade, porém não se pode afirmar que isso altera de forma significativa o potencial reprodutivo / fecundante daqueles; para isso, seria necessária a continuação do acompanhamento clínico de cada cão.

Sobre a avaliação ginecológica das cadelas distróficas avaliadas neste experimento, verificou-se que apresentaram maturidade sexual e características de cio - mudanças comportamentais e citologia vaginal esfoliativa - compatíveis com fêmeas normais, porém são necessários estudos mais detalhados, como dosagem mensal de hormônios reprodutivos, bem como um número maior de animais avaliados, para então ser possível a caracterização dos aspectos reprodutivos desses animais.

Na questão que tange às avaliações laboratoriais, pudemos concluir que em relação aos hemogramas, os parâmetros hematológicos dos cães distróficos avaliados durante os doze primeiros meses de vida tiveram poucas alterações relevantes quando comparados aos valores de referência para cães normais, porém recomenda-se a padronização do referido exame para esta raça com cães normais e saudáveis na mesma faixa etária dos animais avaliados, para fins de comparação mais fidedigna. Da mesma forma, é necessária uma avaliação mais profunda sobre a capacidade de absorção nutricional dos cães distróficos, para que seja possível diferenciar um problema nutricional relacionado diretamente à distrofia de um problema proveniente de manejo nutricional errado, por exemplo.

Em relação aos exames de bioquímica sérica, concluímos que a enzima CK comprovou mais uma vez ser indispensável para diagnóstico e acompanhamento da distrofia muscular em cães. As variações fenotípicas entre cães de uma mesma colônia são muito grandes, por isso não é aconselhável a comparação isolada de valores dessa enzima entre os animais, e sim mensurações freqüentes de um mesmo cão, e associação com outros exames a fim de obter o curso clínico da doença em cada indivíduo.

Valores de ALT estão muito aumentados em todas as faixas etárias estudadas, porém os cães não apresentam sintomas de doença hepática primária, assim é preciso o estabelecimento de outros exames para fins da avaliação de função hepática em cães distróficos.

Avaliação de creatinina sérica não indica nenhum dano renal em cães distróficos ate os 12 meses de idade, portanto são necessários exames mais sensíveis para detecção de lesões renais em animais assintomáticos.

E, por ultimo, pudemos aferir que em relação à avaliação cardíaca, os parâmetros cardíacos avaliados nos animais distróficos foram significantemente diferentes comparados àqueles encontrados em cães sadios normais, porém sem deficit na fisiologia cardíaca nos GRMDs.

Avaliação cardiológica por ecocardiografia convencional, modo-M, não é capaz de detectar alterações cardiológicas em GRMDs em fase pré-clínica da doença. Assim, para detecção precoce de cardiomipatias em cães distróficos aos 12 meses idade, são necessários exames mais avançados, como o "Tissue Doppler".

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLOM, E. The ultrastruture of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermiogram. **Nordisk Veterinaemedicin**, vol. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.

BOON, J.; WINGFIELD, W. E.; MILLER, C. W. Echocardiographic indices in the normal dog. **Veterinary Radiology**, v. 24, n. 5, p. 214-221, 1983.

BROWN, S. A.; HENIK, R. A. Diagnosis and treatment of systemic hypertension. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 28, n. 6, p. 1481-1494, 1998.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2004. 376 p.

CHETBOUL, V.; CARLOS, C.; BLOT, S.; THIBAUD, J. L.; ESCRIOU, C.; TISSIER, R.; RETORTILLO, J. L.; POUCHELON, J. Tissue Doppler assessment of diastolic and systolic alterations of radial and longitudinal left ventricular motions in Golden Retrievers during the preclinical phase of cardiomyopathy associated with muscular dystrophy. **American Journal of Veterinary Research,** v. 65, n. 10, p. 1335-1341, 2004a.

CHETBOUL, V.; ESCRIOU, C.; TESSIER, D.; RICHARD, V.; POUCHELON, J.; THIBAULT, H.; LALLEMAND, F.; THUILLEZ, C.; BLOT, S.; DERUMEAUX, G. Tissue Doppler imaging detects early asymptomatic myocardial abnormalities in a dog model of Duchenne´s cardiomyopathy. **European Heart Journal**, v. 25, n. 21, p. 1934-1939, 2004b.

COZZI, F.; CERLETTI, M.; LUVONI, G. C.; LOMBARDO, R.; FAVERZANI, P. G. B. S.; BLASEVICH, F.; CORNELIO, F.; POZZA, O.; MORA, M. Development

of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. **Acta Neuropathologica**, v. 101, n. 5, p. 469-478, 2001.

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**, vol.84, n.4, p.165-172, 2003.

EDWARDS, N. J. **Bolton's handbook of canine and feline electrocardiography**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1987. 381 p.

GIGER, U. **Hereditary and genetic diseases modern diagnostics for hereditary in dogs and cats.** In WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION WORLD CONGRESS 2003. Philadelphia **Proceedings,** Philadelphia: University of Pennsylvania. On-line. Disponível em: <www.vin.com>. Acesso em 12/12/2004.

HANTON, G.; GEFFRAY B.; LODOLA, A. Echocardiography, a non-invasive method for the investigation of heart morphology and function in dogs: 1. Method and reference values for M-mode parameters. **Laboratory Animals**, v. 32, p.173-182, 1998.

HENIK, R. A. Echocardiography and Doppler ultrasound. In: MILLER, M. S.; TILLEY, L. P. **Manual of canine and feline cardiology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 75-107.

HOFFMAN, E. P.; MORGAN, J. E.; WATKINS, S. C.; PARTDRIGE, T. A. Somatic reversions/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 9-25, 1990.

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

KELLER, P. Enzyme activities in the dog: tissue analyses, plasma values, and intracellular distribution. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, n. 4, p. 575-582, 1981.

KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D. **Kirk's current veterinary therapy – Small animal practice .**11ª ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992. p. 36-39..

KLARENBEEK, S.; GERRITZEN-BUUNING, M. J.; ROZYMULULLER, A. J.; VAN DER LUGT, J. J. Canine X-Linked muscular dystrophy in a family of grand basset griffon vendéen dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 249-252, 2007.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; CUNDIFF, D. D.; PETROSKI, G. F.; SCHUELER, R. O. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 166, p. 115-121, 1999.

KORNEGAY, J. N.; SHARP, N. J.; SCHUELER, R. O.; BETTS, C. W. Tarsal joint contracture in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 4, p. 331-333, 1994.

LUPPI, M. M. C. P. **Avaliação andrológica de cães de raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular**. 2006. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MEYER, D. J.; HARVEY J. W. **Veterinary laboratory medicine:** interpretation and diagnosis. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998.

MUZZI, R. A. L.; ARAÚJO, R. B.; MUZZI, L. A. L.; PENA, J. L. B. Ecocardiografia modo M em cães normais da raça Pastor Alemão (origem americana) do canil da polícia militar do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 819-824, 2000.

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. 123, n. 2-3, p. 100-108, 2002.

PELLEGRINO, A.; PETRUS, L. C.; PEREIRA, G. G.; SOARES, E. C.; YAMATO, R. J.; FERNANDEZ, E. L. F.; LARSSON, M. H. M. A. Padronização de parâmetros ecocardiográficos de cães da raça Golden Retriever clinicamente sadios. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1039-1044, 2007.

SCHATZBERG, S. J.; SHELTON, G. D. Newly identified neuromuscular disorders. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, n.6, p.1497-1524, 2004.

SCHELLING, C.G. Radiology of the heart. In: MILLER, M. S.; TILLEY, L. P. **Manual of canine and feline cardiology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p. 17-45.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Muscular dystrophies and other inherited myopathies. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 32, n. 1, p. 103-124, 2002.

SHELTON, G. D.; LIU, L. A.; GUO, L. T.; SMITH, G. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; THOMAS, W. B.; SMITH, M. O.; KLINE, K. L.; MARCH, P. A.; FLEGEL, T.;

ENGVALL, E. Dystrophy in female dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 3, p. 240-244, 2001.

SHIMATSU, Y.; KATAGIRI, K.; FURUTA, T.; NAKURA, M.; TANIOKA, Y.; YUASA, K.; TOMOHIRO, M.; KORNEGAY, J. N.; NONAKA, I.; TAKEDA, S. Canine X-Linked Muscular Dystrophy in Japan ($CXMD_J$). **Experimental Animals**, v. 52, n. 2, p. 93-97, 2003.

SNYDER, P. S.; SATO, T.; ATKINS, C. E. A comparison of Echocardiographic indices of the nonracing, healthy greyhound to reference values from other breeds. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 36, n. 5, p. 387-392, 1995.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação Artificial em cães. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIQUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Editora Varela, 2002. p. 70-73.

SORRIBAS, C. E. **Atlas de reprodução canina**. São Caetano do Sul: Interbook, 2006. 348 p.

TILLEY, L. P. **Essentials of canine and feline electrocardiography**. 3. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1995. 484 p.

UCHIYAMA, T.; TOKOI, K.; DEKI, T. Successive changes in the blood composition of experimental normal beagle dogs associated with age. **Jikken Dobutsu**, v. 34, n. 4, p. 367-377, 1985.

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

VALENTINE, B. A.; 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.; 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.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães. **Clínica Veterinária**, v. 3, n. 15, p. 22-26, 1998.

VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; BAME, J. H. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science,** v. 74, p. 3827-3835, 1991.

WELLS, D. J.; WELLS, K. E. What do animal models have to tell us regarding Duchenne muscular dystrophy? **Acta Myologica**, v. 24, n. 3, p. 172-180, 2005.

YIN, Y. Z.; HAWKINS, K. L.; DEWOLF, W. C. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 159-165, 1997.

YUGETA, N.; URASAWA, N.; FUJII, Y.; YOSHIMURA, M.; YUASA, K.; WADA, M. R.; NAKURA, M.; SHIMATSU, Y.; TOMOHIRO, M.; TAKAHASHI, A.; MACHIDA, N.; WAKAO, Y.; NAKAMURA, A.; TAKEDA, S. Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan ($CXMD_J$): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 6, n. 1, p. 1-47, 2006.

APENDICE A

Tabela 11 – Valores de referência para hemogramas de cães saudáveis em diferentes faixas etárias – São Paulo - 2008

HEMOGRAMA	ATÉ 3 MESES	3 – 6 MESES	6 – 12 MESES	1 – 8 ANOS	ACIMA DE 8 ANOS
He(milhões/mm^3)	3-5 a 6	5,5-7	6-7	5,5-8,5	5,7-7,4
Hb (g%)	8,5-13	11-15,5	14-17	12-18	14-18
Ht (%)	26-39	34-40	40-47	37-55	38-47
VCM (µ^3)	69-83	65-78	65-78	60-77	63-77
HCM (µµg)	22-25	20-24	21-25	19,5-24,5	21-26
CHCM (%)	31-33	30-35	30-35	30-36	31-35
PTs (g%)	4-6	5-6,5	5-7	5,5-8,0	6-8
Leuc. (mil/mm^3)	8.5-17.3	8-16	8-16	6-17	6-16
Bastonetes (%)	0-1	0-1	0-1	0-3	0-1
Segmentados (%)	46-68	47-69	55-77	60-77	55-80
Eosinófilos (%)	1-5	1-5	1-6	2-10	1-9
Linfócitos (%)	30-48	28-45	20-40	12-30	13-40
Basófilos (%)	0	0	0-1	0-1	0-1
Monócitos (%)	1-10	1-10	2-8	3-10	1-6
		Plaquetas:	200.000 a	500.000	

Fonte: www.fmvz.unesp.br/eventos/especialização/disciplinas/laboratorioclinico/valores_ref.pdf

APENDICE B

Tabela 12 – Valores de referência para hemogramas de cães saudáveis em diferentes faixas etárias – São Paulo, 2008

HEMOGRAMA	ATÉ 3 MESES	3 – 6 MESES	6 – 12 MESES	1 – 8 ANOS	ACIMA DE 8 ANOS
He (milhões/mm^3)	4 a 6	5,5-7	6-7	6-8	4-7
Hb (g%)	9,5-13	11-15,5	14-17	14-18	14-19
Ht (%)	26-36	34-40	40-47	40-53	40-56
VCM (μ^3)	65-78	65-78	65-78	65-78	65-78
HCM (μμg)	20-24	20-24	21-25	21-26	21-26
CHCM (%)	30-34	30-35	30-35	31-35	31-35
PTs (g%)	4-6	5-6,5	5-7	5,5-8	6-8
Leuc. (mil/mm^3)	9-15	9-15	9-15	8-16	9-16
Bastonetes (%)	0-1	0-1	0-1	0-2	0-1
Segmentados (%)	46-68	47-69	55-70	58-78	55-80
Eosinófilos (%)	1-5	1-5	1-6	1-8	1-9
Linfócitos (%)	30-48	28-45	20-40	10-26	13-40
Basófilos (%)	0	0	0-1	0-1	0-1
Monócitos (%)	1-10	1-10	2-8	2-8	1-6
		Plaquetas:	200.000 a	500.000	

Fonte: "Current Veterinary Therapy – Small Animal Practice" – Robert W. Kirk / John D. Bonagura – 1992.