

Influência do bloqueador de receptor de angiotensina (Losartana potássica) na função renal e pressão arterial em cães GRMD¹

Marina Brito Silva^{2*}, Angélica O. Almeida², Leandro Fadel², Carlos E. Ambrósio² e Maria Angélica Miglino²

ABSTRACT.- Silva M.B., Almeida A.O., Fadel L., Ambrósio C.E. & Miglino M.A. 2009. [Influence of angiotensin receptor blocker of renal function and arterial pression in GRMD dogs.] Influência do bloqueador de receptor de angiotensina na função renal e pressão arterial em cães GRMD. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(4):322-326. Setor de Anatomia, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270, Brazil. E-mail: marinabrito@usp.br

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular disorder characterized by a continuous muscle necrosis and degeneration with eventual fibrosis and fatty tissue infiltration. Progressive increase in muscle interstitial fibrosis prevents the movement of myogenic cells, which is necessary for myotube formation. Canine model is the best phenocopies of the disease in humans when comparing with others animal models with dystrophy. Anti-fibrotic treatment of DMD patients, targeting the cytokine mediators, TGF-beta, and the treatment with antiinflammatories, may limit muscle degeneration and contribute for the improvement of the course of the illness. This work aimed to verify the possible adverse effects in renal physiology by means of evaluation sanguineous biochemist and arterial pressure, in order to verifying the viability of Losartan (a TGF-beta inhibitor) in affected dogs by muscle dystrophy. It was used four adults dogs, two of each gender. A dose of 50mg of Losartan was orally given once a day. The clinical exams, the kidney function, arterial blood pressure and potassium level did not show any adverse effect through the experimental period. Losartan utilization showed to be a safe therapy for the antifibrotic treatment in adults dogs, not affecting neither the kidney function nor the arterial blood pressure.

INDEX TERMS: Losartan, canine dystrophy, Duchenne, renal function, arterial pression.

RESUMO.- A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma alteração neuromuscular caracterizada por contínua necrose muscular e degeneração, com eventual fibrose e infiltração por tecido adiposo. O aumento progressivo da fibrose intersticial no músculo impede a migração das células miogênicas, necessárias para a formação muscular. O modelo canino constitui-se nas melhores fenocópias da doença em humanos, quando comparados

com outros modelos animais com distrofia. O tratamento antifibrose de pacientes DMD, tendo como alvo os mediadores da citocina, TGF-beta, e o tratamento com antiinflatórios, podem limitar a degeneração muscular e contribuir para a melhora do curso da doença. O presente estudo teve como objetivo observar os possíveis efeitos adversos na fisiologia renal, por meio de avaliação bioquímica sanguínea e da pressão arterial, verificando a viabilidade do uso do Losartan (um inibidor de TGF-beta) nos cães afetados pela distrofia muscular. Foram utilizados quatro cães adultos, sendo dois machos e duas fêmeas. Utilizou-se a dose de 50mg de Losartan, administrada via oral, uma vez ao dia. Os exames clínicos, bem como alterações na função renal, o nível do potássio sérico e a pressão arterial não evidenciaram reação adversa

¹ Recebido em 6 de outubro de 2008.

Aceito para publicação em 13 de janeiro de 2009.

² Setor de Anatomia, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. *Autor para correspondência: marinabrito@usp.br

durante todo o período do experimento. O uso de Losartan, por um período de 9 semanas, mostrou-se como uma terapia segura para o tratamento antifibrótico em cães adultos, não afetando a função renal ou pressão arterial dos animais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Losartan, distrofia canina, Duchenne, função renal, pressão arterial

INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma alteração neuromuscular hereditária que afeta, aproximadamente, um em cada 3.500 indivíduos do sexo masculino, com herança ligada ao cromossomo X, de caráter recessivo. É caracterizada por contínua necrose muscular e degeneração, com eventual fibrose e infiltração por tecido adiposo (Howell et al. 1997). Sua fisiopatologia é determinada pela ausência ou disfunção da distrofina, proteína encontrada numa variedade de tecidos, principalmente nas musculaturas esquelética e cardíaca, nervos e regiões específicas do sistema nervoso central. Clinicamente, caracteriza-se por severa alteração na musculatura esquelética, resultando em morte precoce do indivíduo acometido (Pacioretty et al. 1994, Anderson et al. 2002, Childers et al. 2002, Hainsey et al. 2003).

Camundongos e cães com distrofia muscular, ambos com defeito na distrofina dos tecidos musculares, são modelos para a DMD em humanos (Cozzi et al. 2001, Nguyen et al. 2002). Porém, os cães constituem-se nas melhores fenocópias da doença em humanos, quando comparados com outros modelos animais (Bogdanovich et al. 2003, Collins & Morgan 2003). A distrofia muscular canina ligada ao cromossomo X é reconhecida e mais bem caracterizada em cães da raça Golden Retriever, nos quais ocorre de forma espontânea (Shimatso et al. 2003). Colônias de cães com distrofia muscular foram estabelecidas e estudos sobre genética, clínica, patogenia, biologia molecular e imunocitoquímica realizados no modelo canino têm sido úteis na avaliação da distrofia muscular de Duchenne em humanos (Valentine 1992).

A falta de distrofina na DMD resulta em necrose da fibra muscular, logo no início da doença, e a capacidade de regeneração fica comprometida ao longo do curso da mesma (Chargé & Rudnick 2004).

Estudo feito por Cozzi et al. (2001), revelou que a substituição do músculo por tecido fibrótico foi evidenciada bem antes de completar a maturação muscular, mostrando que esta não é um fator crítico para a iniciação da necrose da fibra no modelo canino, ao contrário do sugerido para a DMD.

O aumento progressivo da fibrose intersticial no músculo impede a migração das células miogênicas, que são necessárias para a formação muscular (Luz et al. 2002). A fibrose é capaz de limitar a utilidade de terapias gênicas ou transplantação mioblástica para corrigir o defeito primário, já que a proliferação de tecido conectivo barra o suporte nutricional para a fibra muscular e a migração e fusão de

novas células implantadas. O tratamento anti-fibrose de pacientes DMD, tendo como alvo os mediadores da citocina, TGF-beta bem como o tratamento com anti-inflamatórios, pode limitar a degeneração muscular e contribuir para a melhora do curso da doença (Passerini et al. 2002)

Estudos com o modelo canino da distrofia muscular têm sido desenvolvidos no Brasil, envolvendo grupos de pesquisa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) e do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, sobre os aspectos clínicos e morfológicos dos cães afetados (Ambrósio, 2008) e sobre a utilização de células-tronco (Kerkis et al. 2008). Estes estudos trazem esperanças para o tratamento da distrofia muscular. No entanto, enquanto a aplicação dos mesmos não se torna viável, os tratamentos com fármacos que possam melhorar a qualidade de vida de pacientes com DMD tornam-se cada vez mais importantes.

O Losartan é uma potente droga anti-hipertensiva, inibidora dos receptores AT1 da angiotensina II, sendo que seu uso vem sendo sugerido promissoriamente como opção terapêutica no tratamento de doenças musculares progressivas, pela inibição do TGF-beta.

Estudo recente demonstrou que o Losartan normaliza a síntese de colágeno, em camundongos, revertendo a fibrose ventricular esquerda em ratos com hipertensão espontânea (SHR) (Varo et al. 2007). Estes achados sugerem que o tratamento com Losartan restaura a atividade da collagenase no ventrículo esquerdo de SHR. Portanto, o efeito antifibrótico desta droga em SHR parece ser não apenas por sua habilidade em diminuir a síntese de colágeno tipo I, mas também devido sua capacidade de estimular a degradação do colágeno. Paralelamente, observou-se que a administração do Losartan promoveu a diminuição da expressão do TGF-beta, um fator de crescimento que está presente e aumentado no ventrículo esquerdo dos SHR (Varo et al. 2007).

Wagner et al. (2002) relataram que a reposição por tecido fibrótico e gorduroso, em diafragma de camundongo *mdx*, como resultado de repetidos ciclos de degeneração e diminuição de regeneração muscular, parece ser atenuada na falta da miostatina (membro da família do TGF-beta). Estes achados corroboram a hipótese que a regeneração muscular pode estar relacionada com a inibição da atividade do TGF-beta, cuja proposta está sendo elaborada com o uso do Losartan (Wagner et al. 2002).

O tratamento com Losartan, pelo fato de ser um inibidor de angiotensina, é originalmente usado para o tratamento da hipertensão e está relacionado com a queda nos níveis de aldosterona. Portanto, os pacientes podem apresentar aumento nos níveis de potássio, uréia e creatinina (Mazzolai & Burnier 1999)

O presente trabalho tem o objetivo de observar os possíveis efeitos adversos na fisiologia renal de cães GRMD, submetidos a tratamento com Losartan, por meio de análise bioquímica sanguínea e da pressão arterial, avaliando a viabilidade do uso desta droga em cães afetados pela distrofia muscular.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro cães adultos da raça Golden Retriever, afetados pela distrofia muscular de Duchenne (GRMD), sendo dois cães machos e duas fêmeas, pertencentes ao grupo de animais do canil GRMD Brasil, localizado no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP). O estudo foi conduzido de acordo com as normas éticas, após aprovação pela Comissão de Bioética da FMVZ-USP (Protocolo 1175/2007).

Antes de começar a utilizar o Losartan com o efeito antifibrótico, foi realizado estudo piloto para verificar a influência na função renal referente a dosagem de 50mg do Losartan e possíveis reações adversas. O protocolo para uso do Losartan foi estabelecido com referência em experimentos previamente feitos em cães e humanos (Wong et al. 1991, Goa & Wagstaff 1996, Hashimoto et al. 1999, Suzuki et al. 2001)

Utilizou-se a dose de 50mg de Losartan, administrada via oral, juntamente com a ração triturada e hidratada com água, uma vez ao dia, pela manhã durante primeira refeição. Os animais passaram por exames clínicos semanais, de acordo com ficha clínica estipulada pelos médicos veterinários do Canil GRMD-USP, nos quais foram avaliados: temperatura retal, auscultação cardiopulmonar, palpação abdominal, avaliação de mucosas e palpação de linfonodos, de modo a identificar eventuais efeitos adversos do uso da droga e, também, com o objetivo de acompanhar a evolução da doença nos cães tratados.

Foram avaliadas a pressão arterial (PA) e a função renal. As mensurações foram feitas no primeiro momento determinado como tempo zero (T0), antes do início do tratamento, para obter os valores de cada animal. Iniciada a terapia com Losartan, as mensurações seguintes foram feitas semanalmente, durante três semanas, (T1, T2, T3). Na quinta semana, ou seja, após quinze dias de T3, foi feita a quarta mensuração (T4). Foi dado um intervalo de um mês, quando se fez a última mensuração - tempo final (Tf).

A PA foi aferida utilizando aparelho Doppler vascular portátil modelo DV2001. A mensuração da pressão arterial foi realizada com o animal em decúbito lateral, posicionando-se o manguito logo abaixo da articulação úmero-rádio-ulnar, com o transdutor sobre a artéria palmar na região metacarpiana.

Os exames de sangue foram coletados pela punção da veia cefálica, colhendo-se, aproximadamente, 2mL de sangue. O material colhido foi transferido para um tubo de vidro siliconizado, contendo gel separador de soro (Vacuntainer SST®, Becton Dickinson), centrifugado a 1500g durante 15 minutos para obtenção do plasma sanguíneo. Todos os exames foram processados pelo Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP.

As análises bioquímicas foram realizadas em analisador automático (Liasys, Roche), utilizando kit comercial. As análises incluíram a determinação das concentrações séricas de uréia, creatinina e potássio, para a avaliação da função renal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O exame clínico feito nos animais semanalmente não evidenciou reação adversa ao uso do medicamento, sendo mantida a evolução natural da doença. Os principais efeitos adversos observados em humanos incluem: discreto aumento do nível sérico de potássio; hipertensão de rebote, e há relato de dois casos de pancreatite associada ao uso do Losartan (Mazzolai & Burnier 1999)

Brazeau et al. (1992) e Morini et al. (2008) destacaram a importância do estudo de doenças humanas em modelos animais para a avaliação pré-clínica de possíveis modalidades de tratamento e para a detecção de anormalidades que possam alterar a farmacocinética de agentes terapêuticos administrados.

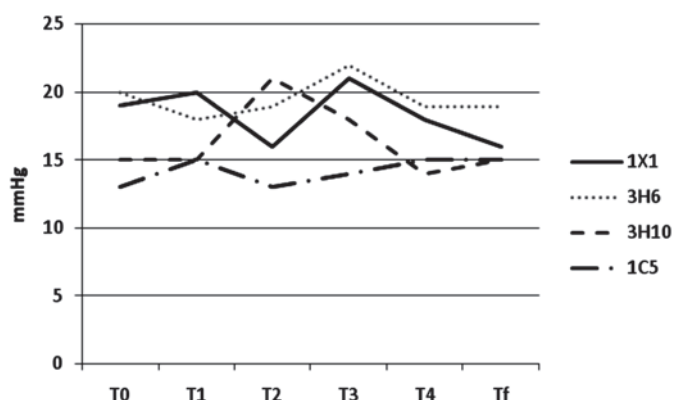


Fig.1. Valores obtidos na mensuração da pressão arterial nos diferentes tempos em cães GRMD sob administração do losartan.

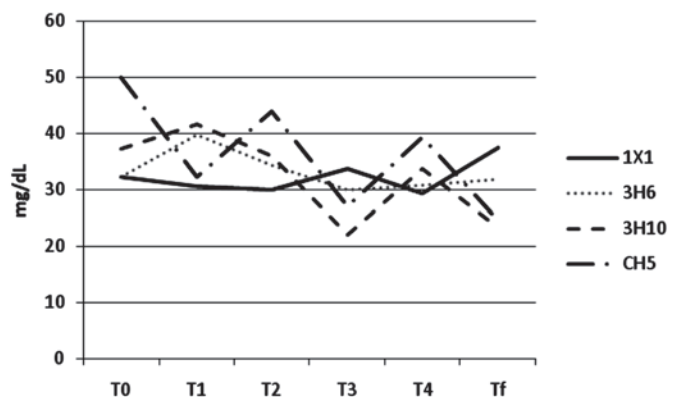


Fig.2. Valores obtidos na mensuração da uréia sérica nos diferentes tempos em cães GRMD sob administração do losartan.

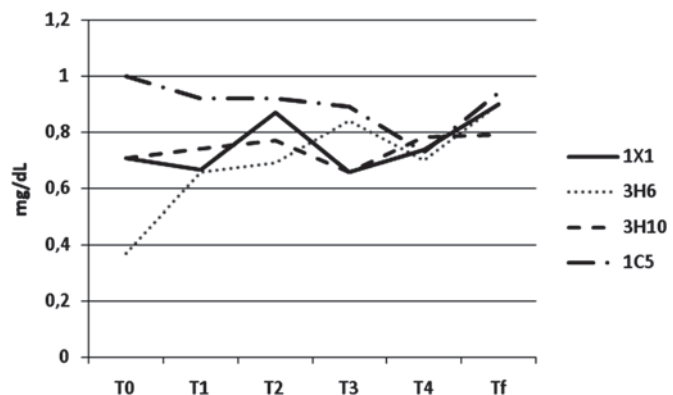


Fig.3. Valores obtidos na mensuração da creatinina sérica nos diferentes tempos em cães GRMD sob administração do losartan.

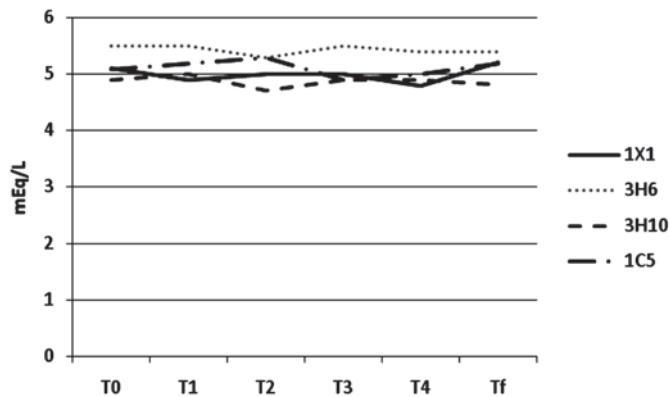


Fig.4. Valores obtidos na mensuração do potássio sérico nos diferentes tempos em cães GRMD sob administração do losartan.

Durante o experimento os valores da PA (sistólica) sofreram um aumento após o início da administração do Losartan, este aumento, chamado de hipertensão de rebote, como resultado do aumento do nível plasmático da angiotensina II, como resposta compensatória ao bloqueio dos receptores AT1, que normalmente é transitória (Mazzolai & Burnier 1999). Mas as mensurações não indicaram quadro de hipotensão significativa em relação à pressão inicial.

Durante o estudo, os animais não apresentaram alterações na função renal, mantendo os níveis de potássio, uréia e creatinina (Fig.2, 3 e 4, respectivamente) dentro dos parâmetros de normalidade, de acordo com o padrão estabelecido pelo Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da FMVZ-USP (HOVET). Os valores de referência utilizados para cães adultos normais são: até 40mg/dL para uréia, até 1,5-2,0mg/dL para creatinina e 3,8-5,2mEq/L para o potássio.

O tratamento com Losartan, pelo fato de ser um inibidor do receptor da angiotensina causa uma diminuição da retenção de água e sais pelos rins e diminui a liberação da aldosterona, ocasionando assim uma baixa reabsorção de água e sais nos túbulos renais. Portanto, os pacientes podem apresentar alteração nos níveis de potássio, uréia e creatinina. Porém, em pacientes hipertensos com função renal normal, o aumento desses valores foi praticamente insignificante (Mazzolai & Burnier 1999).

Segundo Goa & Wastaff (1996), a função renal está preservada durante administração do Losartan em humanos. A frequência de filtração glomerular, o fluxo sanguíneo renal, o volume urinário, ou outros parâmetros renais, não foram alterados em pacientes normais recebendo dosagem única de 100mg e em pacientes com hipertensão, recebendo 50mg do Losartan diariamente por períodos de sete dias a um ano.

Em paciente com disfunção renal, a excreção da creatinina também não foi alterada durante a terapia com Losartan durante 1-12 semanas (Goa & Wastaff 1996).

Os valores de PA, uréia, creatinina e potássio foram submetidos à análise de variância. A variação dos valo-

res obtidos nos exames foi significativa quando observada entre os animais. Porém as médias apresentadas pelos animais individualmente ao longo dos diferentes tempos não foram significativas, com exceção da uréia que não apresentou variação significativa entre os animais e também ao longo do tempo.

De acordo com as Figuras 1 a 4, observa-se que houve alteração dos valores absolutos encontrados nos exames durante o experimento, mas em nenhum momento esses valores saíram dos parâmetros estabelecidos para cães adultos. Os animais que apresentaram valores altos de pressão arterial no início mostraram uma ligeira diminuição, e os animais que já estavam dentro dos valores normais continuaram com a PA ideal.

CONCLUSÕES

Durante o período de estudo com o Losartan não foi observada nenhuma alteração relevante quanto à avaliação clínica dos animais.

O uso de Losartan, por um período de nove semanas, mostrou-se uma terapia segura para o tratamento antifibrótico em cães adultos, não afetando a função renal ou pressão arterial dos animais.

Agradecimentos.- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

- Ambrósio C.E., Valadares M.E., Zucconi E., Cabral R., Pearson P.L., Gaiad T.P., Canovas M., Vainzof M., Miglino M.A. & Zatz M. 2008. Ringo, a golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. *Neuromuscular Disorders* 18(11):892-893.
- Anderson J.L., Head S.I., Rae C. & Morley J.W. 2002. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain* 125:4-13.
- Bogdanovich S., Perkins K.J., Krag T.O. & Khurana T.S. 2003. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: Current approaches and futures directions. *J. Molecular Med.* 82:102-115.
- Brazeau G.A., Mathew M. & Entrikin R.K. 1992. Serum and organ indices of the mdx dystrophic mouse. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 77:179-189.
- Chargé S.B. & Rudnick M.A. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84:209-238.
- Childers M.K., Okamura C.S., Bogan D.J., Bogan J.R., Petroski G.F., McDonald K. & Kornegay J.N. 2002. Eccentric contraction injury in dystrophic canine muscle. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 83:1572-1578.
- Collins C.A. & Morgan J.E. 2003. Duchenne's muscular dystrophy: Animal model used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int. J. Exp. Pathol.* 84:165-172.
- Cozzi F., Cozzi F., Cerletti M., Luvoni G.C., Lombardo R., Brambilla P.G., Faverzani S., Blasevich F., Cornelio F., Pozza O. & Mora M. 2001. Development of muscle pathology in canine x-linked muscular dystrophy. II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. *Acta Neuropathol.* 101:469-478.
- Goa K.L. & Wagstaff A.J. 1996. Losartan Potassium: A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. *Drugs* 51:820-845.
- Hainsey T.A., Senapati S., Kuhn D.E. & Rafael J.A. 2003. Cardiomyopathic features associated with muscular dystrophy are independent of dystrophin absence in cardiovascular. *Neuromuscular Disorders* 13:294-302.

- Hashimoto Y., Ohashi R., Minami K. & Narita H. 1999. Comparative study of TA- 606: A novel angiotensin II receptor antagonist, with Losartan in terms of species difference and orthostatic hypotension. *J. Pharmacol.* 81:63-72.
- Howell J., Fletcher S., Kakulas BA., O'Hara M., Lochmuller H. & Karpati G. 1997. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. *Neuromuscular Disorders* 7:325-328.
- Kerkis I., Ambrosio E., Kerkis A., Martins D., Zucconi E., Fonseca S., Cabral R., Maranduba C., Gaiad T., Morini A., Vieira N., Brolio M., Miglino M., Sant'Anna O. & Zatz M. 2008. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J. Transl. Med.* 6:35.
- Luz M.A.M., Marques M.J. & Santo Neto H. 2002. Impaired regeneration of dystrophin- deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:691-695.
- Mazzolai L. & Burnier M. 1999. Comparative safety and tolerability of angiotensin II receptor antagonists. *Drug Safety* 21:23-33.
- Morini A.C., Miglino M.A., Carvalho M.B., Martins D., Ambrosio C.E., Gaiad T.P. & Zatz M. 2008. Análise das dosagens e concentrações séricas da ciclosporina A em cães da raça Golden Retriever normais ou afetados pela distrofia muscular. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 45:131-137.
- Nguyen F., Cherel Y., Guigand L., Goubault-Leroux I. & Wyers M. 2002. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. *J. Comp. Pathol.* 126:100-108.
- Pacioretty L.M., Linda M., Cooper, Barry J., Gilmour & Robert F. 1994. Cellular and molecular biology: Reduction of the transient outward potassium current in canine X-linked muscular dystrophy. *Circulation* 90:1350-1356.
- Passerini L., Bernasconi P., Baggi F., Confalonieri P., Cozzi F., Cornelio F. & Mantegazza R. 2002. Fibrogenic cytokines and extent of fibrosis in muscle of dogs with x- linked golden retriever muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 12:828-835.
- Shimatso Y., Katagiri K., Furuta T., Nakura M., Tanioka Y., Yuasa K., Tomohiro M., Kornegay J.N., Nonaka I. & Takeda S. 2003. Canine X linked muscular dystrophy in Japan (CXMDj). *Exp. Animal* 52:93-97.
- Suzuki J., Ohta H., Hanada K., Kawai N., Ikeda T., Nakao M., Ikemoto F. & Nishikibe M. 2001. Acute effects of E-3174, a human active metabolite of Losartan on the cardiovascular system in tachycardia-induced canine heart failure. *Hypertens. Res.* 24:65-74.
- Valentine B.A. 1992. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: A review. *Am. J. Med. Genetics* 42:352-356.
- Varo N., Iraburu M.J., Varela M., López B. & Etayo J.C., Díez J. 2007. Chronic AT1 blockade stimulates extracellular collagen type 1 degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35:1197-1202
- Wagner K.R., McPherron A.C., Winik N. & Lee S.J. 2002. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann. Neurol.* 52:832-836.
- Wong P.C., Hart S.D., Duncia J.V. & Timmermans P.B. 1991. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Studies with DuP 753 and EXP3174 in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 202:323-330.