CAROLINA COSTOLA DE SOUZA

**Existem interferências hormonais e modificações morfológicas
das glândulas endócrinas tireóide e adrenais na evolução da
Distrofia Muscular do cão Golden Retriever?**

São Paulo
2010

CAROLINA COSTOLA DE SOUZA

Existem interferências hormonais e modificações morfológicas das glândulas endócrinas tireóide e adrenais na evolução da Distrofia Muscular do cão Golden Retriever?

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^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2373
FMVZ

Souza, Carolina Costola de

Existem interferências hormonais e modificações morfológicas das glândulas endócrinas tireóide e adrenais na evolução da Distrofia Muscular do cão Golden Retriever? / Carolina Costola de Souza. -- 2010.

129 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Golden Retriever Muscular Dystrophy. 2. Triiodotironina. 3. Tiroxina. 4. Tireotropina. 5. Cortisol. I. Título.

ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
94	16	portadoras	afetadas
94	17	portadoras	afetadas
116	28	portadoras	afetadas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Existem interferências hormonais e modificações morfológicas das glândulas endócrinas tireóide e adrenais na Distrofia Muscular do cão Golden Retriever?", utilizando 51 (cinquenta e um) cães, protocolado sob o nº1639/2009, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/04/09.

We certify that the Research "Are there hormonal interferences and morphological changes in thyroid and adrenal endocrine glands in Golden Retriever Muscular Dystrophy?", utilizing 51 (fifty-one) dogs, protocol number 1639/2009, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/22/09.

São Paulo, 20 de agosto de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

NOME: **SOUZA, Carolina Costola de**

TÍTULO: **Existem interferências hormonais e modificações morfológicas das glândulas endócrinas tireóide e adrenais na evolução da Distrofia Muscular do cão Golden Retriever?**

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: ____/____/2010.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Dedico a DEUS, pela minha existência, porque nada nos é possível se não for de Sua vontade.

Dedico esta pesquisa a todos os pacientes com distrofia muscular. Que Deus dê forças para vocês superarem todos os obstáculos da vida.

A minha amada família:

Aos meus pais Mário José de Souza e Sônia Aparecida Costola de Souza pela confiança em mim depositada, pelo apoio e por todo incentivo. Amo muito vocês, papai e mamãe.

A minha querida irmã Flávia Costola de Souza, grande e determinada menina, muito obrigada pelo apoio e ajuda nos momentos difíceis da vida. Que Deus te acompanhe nesta etapa e guie teus passos.

Ao meu amado namorado Ulysses Pavaní, pelo amor, apoio e companheirismo em todas as minhas escolhas. Eu te amo, meu príncipe encantado!

Agradeço a Professora Maria Angélica Miglino, por todos os ensinamentos, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade dada.

A Professora Daniele dos Santos Martins, por toda ajuda e paciência fundamentais para a finalização desta importante etapa da minha vida.

Ao Professor José Luiz Guerra, pela imediata disponibilidade para me socorrer com minhas dúvidas.

A todos os Professores do departamento Carlos Eduardo Ambrósio, Pedro Bombonato, José Roberto Kfoury, Patricia Braga, Graciela Pignatari, pelas inúmeras aulas, fazendo o possível para sermos excelentes profissionais.

Aos técnicos Rose Eli Rici, Ronaldo Agostinho da Silva e Diogo Palermo, pela ajuda, disposição e pela paciência em ensinar as mais variadas técnicas de laboratório.

Aos meus avós, Aparecida Costola, Deoclécio Luiz Costola e Verônica B. L. de Souza, pelo amor imensurável.

Aos meus tios e primos, Márcia Costola, Catia Costola Horn, Luiz Gotardo Costola, Guilherme Horn, Valter Prado, Jacqueline C. Horn, Giovanna C. Horn, Tereza, Wanderley, Maria José, Manoel, Maria de Lourdes, Paulo, Maria Antonia, Renata, Ana Paula, Déborah, Rodrigo, Débora, Eduardo e Aline.

A minha melhor amiga Renata Avancini Fernandes, pela indicação e toda ajuda profissional e pessoal. Agradeço, pois sempre dispôs de papel fundamental na minha vida.

Aos meus amigos, Gislayne Gossi, Bruno Fernandes, Carolina Fernandes, Marco Fernandes, Magaly A. Fernandes, Allan Mattos, Claudio, Rafael, Denis, Andréa Sabbatini, Fernanda Jacob, Ana Julia Scaggion, que têm lugar especial no meu coração.

Aos meus amigos, Ana Maria M. de Souza, Raul de Souza Jr, Cauê M. de Souza, Brunno M. de Souza, Marilene S. Paradella, Marco, Caio Paradella, Patricia Rariana, Roseli R. do Nascimento, Edson do Nascimento, Marcos Vinícius R. do Nascimento, Thiago R. do Nascimento, Thiago Paradella, Renan Paradella, Isabel Avian, Moacir Avian, Leandro Avian, Tiemi Tanaka, Hideo Tanaka, Edson Tanaka, Thomás Calderini, Valdomiro De Marchi, Ondina De Marchi Anderson De Marchi, Leandro De Marchi, Amanda Ferretti, Bianca Tortosa, Patricia Piovesano, Érica Prevelato, Diego Pavani, Mauro Pavani, Leandro Villa, Eduardo Soré, Kaê Gandini, pela diversão de todos os finais de semana.

Aos meus sobrinhos, Pérola Pavani dos Reis, Vitória Mansur, Helena Pavani dos Reis, Paulo Mansur e Pedro Dellevedove, pelo carinho e pela diversão.

A minha mais nova amiga Dilayla Kelly de Abreu, que jamais me negara ajuda e, em toda esta importante etapa, esteve presente com sua indiscutível capacidade profissional e maravilhosa amizade.

Ao Rodrigo Barreto e ao Rafael Agopian, por terem me ensinado muito bem o básico da pesquisa e da anatomia.

A toda equipe do canil, Marina Brólio, Marina Brito, Angélica de Almeida, Leandro Fadel, Greyson Esper, Elaine Rodrigues, Thais Lessa, Luiz Nogueira, Ana Luísa Reginato, Renata Fernandes e Dilayla Abreu, que luta sempre unida pelo bem-estar dos nossos animais.

Aos meus amigos de departamento, Carlos Sarmiento, Vivian Massaroto, Fabiele Russo, Isabella Fernandes, André Francioli, Janaína Monteiro, Paula Fratini, Ana Carolina Mançanares, Alicia Pessolato, Amanda Ferreira, Cristiane Passos, Dayane Alcântara, Marcio Rodrigues, Marcos Vinicius Silva, Valdir Pavanelo, Caio Biasi, Evander Bueno, João Carlos Morini, Juliana Passos, Matheus Feitosa, Adriana Morini e Phelipe Favaron, pelos momentos de alegria.

Aos amigos Maicon Barbosa da Silva, Jaqueline de Santana, Fabiana Fernandes e Tatiane Curti, sempre dispostos a ajudar quando necessário.

Ao INCTC, pelo apoio financeiro à pesquisa.

RESUMO

SOUZA, C. C. **Existem interferências hormonais e modificações morfológicas das glândulas endócrinas tireóide e adrenais na evolução da Distrofia Muscular do cão Golden Retriever?** [Are there hormonal interferences and morphological changes in thyroid and adrenal endocrine glands in Golden Retriever Muscular Dystrophy?]. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As doenças neuromusculares são um grupo heterogêneo de doenças genéticas, causadas por mutações nos genes codificando proteínas musculares sarcolemicas, sarcoméricas, e citosolicas. A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia degenerativa progressiva, caracterizada pela ausência da proteína distrofina na superfície da membrana da célula muscular. O modelo de cão Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) apresenta semelhanças clínicas de DMD devido ao seu tamanho maior e significativa fraqueza muscular, é geneticamente homólogo a DMD humana, sendo considerado modelo experimental para estudos de novas propostas terapêuticas e melhor entendimento da fisiopatogenia da doença. Não existe até o momento uma terapia efetiva em bloquear ou reverter o processo da distrofia muscular. Embora a terapia gênica e o transplante de células tronco possam fornecer a cura para a DMD, resultados positivos podem demorar algum tempo até serem clinicamente viáveis. Neste sentido, a busca de informações fisiopatológicas que podem estar correlacionadas com a distrofia, e, com o avanço da pesquisa há possibilidade de melhora na condição vital do paciente, por retardo da progressão dos sinais clínicos ou cura. Existem poucos estudos endócrinos em animais portadores de distrofia como aves, GRMD e o mdx, assim como no homem. Mediante a falta de dados, houve a necessidade de quantificar e comparar hormônios, ainda não analisados, assim como avaliar a morfologia de glândulas endócrinas no modelo experimental GRMD. Para que fosse possível a correlação na interferência hormonal na evolução da Distrofia Muscular do cão, os exames sanguíneos foram comparados com cães normais e com as portadoras, todos da raça Golden Retriever. A mensuração hormonal de triiodotironina total (T_3T), tiroxina total (T_4T), a tireotropina (TSH) e o cortisol foram processados através de “kits” comerciais para radioimunoensaio, e o tiroxina livre (T_4L) com “kit” comercial por diálise. As análises morfológicas das adrenais e da tireóide foram feitas através da

macroscopia, microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão de materiais de GRMD e de cães saudáveis. Anatomicamente e morfológicamente as glândulas não apresentaram alterações. Os níveis de cortisol não variaram significativamente entre os grupos estudados. Os níveis de T_3 total foi semelhante para os animais saudáveis, portadoras e afetados. T_4 total apresentou-se em diferentes níveis em alguns grupos. O T_4 livre não variou significativamente entre os grupos estudados. Os níveis séricos de TSH da maioria dos Golden Retriever, afetados, portadores e saudáveis, apresentaram-se abaixo do limite apresentado pelos valores de referência.

Palavras-chave: Golden Retriever Muscular Dystrophy. Triiodotironina. Tiroxina. Tireotropina. Cortisol.

ABSTRACT

SOUZA, C. C. **Are there hormonal interferences and morphological changes in thyroid and adrenal endocrine glands in Golden Retriever Muscular Dystrophy?** [Existem interferências hormonais e modificações morfológicas das glândulas endócrinas tireóide e adrenais na evolução da Distrofia Muscular do cão Golden Retriever?] 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Neuromuscular diseases are a heterogeneous group of genetic diseases caused by mutations in genes encoding proteins muscle sarcolemma, sarcomeric, and cytosol. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a progressive degenerative myopathy characterized by absence of dystrophin on the surface membrane of muscle cells. The Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) shows clinical similarities of DMD due to its size and significant muscle weakness, is genetically homologous to human DMD, and is considered an experimental model for studies of new therapeutic approaches and better understanding of the pathogenesis of the disease. There is not an effective therapy to block or reverse the process of muscular dystrophy yet. Although gene therapy and stem cell transplantation may provide a cure for DMD, positive results may take some time to be clinically viable. In this sense, the search for pathologic and physiologic information can be correlated with muscular dystrophy, and with the advancement of research there is room for improvement in the vital condition of the patient by delaying the progression of clinical signs or cure. There are a few studies in animals with endocrine dystrophy such as birds, and GRMD mdx as well as in man. By lack of data, there was a need to quantify and compare hormones, not yet analyzed, as well as evaluating the morphology of endocrine glands in experimental model GRMD. To make possible the hormonal correlation in the evolution of muscular dystrophy in dogs, blood tests were compared with normal dogs and carriers, all Golden Retrievers. Measurement of total triiodothyronine hormone (T_3T), total thyroxine (T_4T), the thyrotropin (TSH) and cortisol were processed using commercial kits for radioimmunoassay, and free thyroxine (FT_4) with commercial kit by dialysis. The morphological analysis of adrenal and thyroid were made by macroscopic, light microscopy and transmission electron microscopy of materials GRMD and healthy dogs. Anatomical and morphological glands were unaffected. Cortisol levels did not differ significantly between groups. The levels of

total T₃ was similar to the healthy animals, carriers and affected. The T₄ presented at different levels in some groups. The free T₄ did not differ significantly between groups. Serum TSH of most Golden Retriever, affected patients and healthy individuals, were below the limit presented by the reference values.

Keywords: Golden Retriever Muscular Dystrophy. Triiodothyronine. Thyroxine. Thyrotropin. Cortisol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fotografia da incisão longitudinal na região de pescoço de uma fêmea portadora da Distrofia Muscular	42
Figura 2 –	Fotomacrografia de estruturas abdominais “in situ” de cão macho GRMD	56
Figura 3 –	Fotomacrografia das glândulas adrenais de cão macho GRMD	57
Figura 4 –	Fotomicrografia de adrenais de cão sadio e cães afetados pela distrofia muscular por HE	59
Figura 5 –	Fotomicrografias de adrenais de GRMD e de cão controle por PAS	60
Figura 6 –	Fotomicrografia de adrenais de cão sadio e cães afetados pela distrofia muscular por Tricrômio de Masson	61
Figura 7 –	Ultra- estruturas da zona glomerulosa das adrenais caninas GRMD e controle em MET	62
Figura 8 –	Ultra- estruturas da zona fasciculada das adrenais caninas GRMD e controle em MET	63
Figura 9 –	Média dos níveis de cortisol por animal estudado e valores de referência	66
Figura 10 –	Gráfico estatístico do nível de cortisol para os diferentes genótipos	67
Figura 11 –	Gráfico estatístico do nível de cortisol para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade	68
Figura 12 –	Fotomacrografia “in situ” das estruturas da região do pescoço de cão macho GRMD e fêmea portadora com dois meses de idade	70
Figura 13 –	Fotografia das tireóides de cão afetado	70
Figura 14 –	Fotomicrografia das estruturas da glândula tireóide em cortes transversais e em coloração HE	73
Figura 15 –	Fotomicrografias das tireóides de GRMD e cão controle por PAS	74
Figura 16 –	Fotomicrografia das estruturas da glândula tireóide em cortes transversais e por coloração Tricrômio de Masson	75
Figura 17 –	Ultra- estruturas de tireóides caninas GRMD e controle por MET	77
Figura 18 –	As células foliculares das tireóides dos GRMD e do cão controle por MET	78
Figura 19 –	Média dos níveis de T ₃ total por animal estudado e valores de referência	81
Figura 20 –	Gráfico estatístico do nível de T ₃ para os diferentes genótipos	82
Figura 21 –	Gráfico estatístico do nível de T ₃ para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade	83

Figura 22 – Média dos níveis de T ₄ total por animal estudado e valores de referência	86
Figura 23 – Gráfico estatístico do nível de T ₄ total para os diferentes genótipos	87
Figura 24 – Gráfico estatístico do nível de T ₄ total para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade	88
Figura 25 – Média dos níveis de T ₄ livre por animal estudado e valores de referência	91
Figura 26 – Gráfico estatístico do nível de T ₄ livre para os diferentes genótipos	92
Figura 27 – Gráfico estatístico do nível de T ₄ livre para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade	93
Figura 28 – Média dos níveis de TSH por animal estudado e valores de referência	96
Figura 29 – Gráfico estatístico do nível de TSH para os diferentes genótipos	97
Figura 30 – Gráfico estatístico do nível de TSH para os diferentes genótipos e sexo	98
Figura 31 – Gráfico estatístico do nível de TSH para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade	99
Figura 32 – Imuno- histoquímica, com diuiação 1:20, para a localização da distrofina em cortes transversais de músculo esquelético de cão sadio	102
Figura 33 – Imuno- histoquímica, com diluição 1:20, da adrenal de cão controle	103
Figura 34 – Imuno- histoquímica, com diluição 1:10, da adrenal de cão controle	104
Figura 35 – Imuno- histoquímica, com diluição 1:20, da tireóide de cão controle	105
Figura 36 – Imuno- histoquímica, com diluição 1:10, da tireóide de cão controle	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Receita para o preparo de resina pura utilizada para o processamento de material na microscopia eletrônica de transmissão	49
Quadro 2 -	Divisão em grupos e subgrupos relacionados com sexo e idade de GRMD, Portadoras e cães controle	51
Quadro 3 -	Características relacionadas a cada animal e suas respectivas glândulas adrenais	57
Quadro 4 -	Características relacionadas a cada animal e suas respectivas glândulas tireóide	71
Quadro 5 -	Análise da função da tireóide através dos resultados dos níveis de T ₃ total, T ₄ total, T ₄ livre e TSH	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores dos níveis de cortisol de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal	65
Tabela 2 –	Valores dos níveis de T_3 total de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal	80
Tabela 3 –	Valores dos níveis de T_4 total de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal	85
Tabela 4 –	Valores dos níveis de T_4 livre de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal	90
Tabela 5 –	Valores dos níveis de TSH de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal	95

LISTA DE SÍMBOLOS

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico hipófise
CK	Creatinoquinase
CPK	Creatinofosfoquinase
DER- 736	Polyglycol di- eposides
DGC	complexo distrofina - glicoproteínas
DMAE	2- (dimethylamine) etanol
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DNA	ácido desoxirribonucléico
DYS-1	Tipo de anticorpo primário
ERL- 4206	Vinyl Cyclohexene Dioxide
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GRMD	Golden Retriever Muscular Dystrophy
HE	Hematoxilina- eosina
HFMD	Hypertrophyc Feline Muscular Dystrophy
HSD de Tukey	Análise estatística de Honestly Significant Difference
IHC	Imuno- histoquímica
Mdx	modelo para o estudo dos mecanismos patogénéticos da mionecrose e regeneração na distrofia muscular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NSA	Nonenyl Succinic Anhydride Modified
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Tampão salina de fosfato
R	Linguagem de programa estatístico de computação
T ₃	Triiodotironina
T ₃ T	Triiodotironina Total
T ₄	Tetraiodotironina ou tiroxina
T ₄ T	Tetraiodotironina ou tiroxina Total
T ₄ L	Tetraiodotironina ou tiroxina Livre
Teste “t” bicaudal de Student	Análise estatística
TGB	moléculas de globulina ligadora de tiroxina
TSH	hormônio tireotrópico ou tireotropina
USP	Universidade de São Paulo
Xp21	taxa de mutação em um gene localizado no braço curto do cromossomo X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVO	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 JUSTIFICATIVA	24
4 REVISÃO DE LITERATURA	25
4.1 A Distrofia Muscular de Duchenne	25
4.2 Os modelo para estudo da DMD	27
4.3 Adrenal, tireóide e seus hormônios	31
4.3.1 As adrenais e o hormônio cortisol	32
4.3.2 A tireóide e os hormônios T ₃ , T ₄ e TSH	35
5 MATERIAL E MÉTODO	41
5.1 Coleta das glândulas	41
5.2 Análise macroscópica	42
5.3 Análise Microscópica	43
5.3.1 Processamento das amostras para microscopia de luz	43
5.3.1.1 Coloração: hematoxilina-eosina (HE)	44
5.3.1.2 Coloração: Ácido Periódico de Schiff (PAS)	45
5.3.1.3 Coloração: Tricromio de Masson	46
5.3.2 Processamento da amostra para microscopia eletrônica de transmissão	47
5.3.3 Imuno- histoquímica (IHC) para distrofina	49
5.4 Animais e grupos experimentais para análise sanguínea	50
5.4.1 Coleta de amostras sanguíneas	52
5.4.2 Exame laboratorial Radioimunoensaio	53
5.4.3 Estatística das análises sanguíneas	54
6 RESULTADOS	55
6.1 A glândula adrenal	55
6.1.1 Resultados macroscópicos	55
6.1.2 Resultados microscópicos	57
6.1.2.1 A glândula adrenal por microscopia de luz	58
6.1.2.2 A glândula adrenal por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	62
6.1.3 Análise hormonal: Cortisol	64
6.2 A glândula tireóide	69
6.2.1 Resultados macroscópicos	69
6.2.2 Resultados microscópicos	71
6.2.2.1 A glândula tireóide por microscopia de luz	71
6.2.2.2 A glândula tireóide por microscopia eletrônica de transmissão	76
6.2.3 Análise hormonal: T ₃ , T ₄ Total, T ₄ Livre e TSH	79
6.2.3.1 T ₃ total	79

6.2.3.2 T_4 total.....	84
6.2.3.3 T_4 livre	89
6.2.3.4 TSH.....	94
6.2.3.5 <i>Análise da função da tireóide através dos resultados laboratoriais</i>	100
6.3 Imuno- histoquímica	102
6.3.1 Imuno- histoquímica na adrenal do cão controle	102
6.3.2 Imuno- histoquímica na tireóide do cão controle	104
7 DISCUSSÃO	106
7.1 A adrenal e o cortisol.....	107
7.2 A tireóide e os hormônios T_3 total, T_4 total, T_4 livre e o TSH.....	111
8 CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS	120

1 INTRODUÇÃO

Doenças primárias da musculatura esquelética, que resultam em degeneração progressiva, regeneração limitada e fibrose de miofibrilas, são denominadas distrofias musculares (BERGMAN et al., 2002). A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular fatal (WILLMANN et al., 2009) e é a forma mais grave, comum e de evolução mais rápida dentre as miopatias hereditárias. Esta teve seu primeiro gene identificado em 1986 e recebeu esse nome em alusão ao neurologista francês que forneceu a primeira descrição completa da patologia, em 1868 (JORDE, 2004).

Trata-se da miopatia degenerativa mais comum (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008) que acomete aproximadamente um em cada 3.500 indivíduos do sexo masculino e mais raramente do sexo feminino, com herança ligada ao cromossomo X de caráter recessivo, sendo causada pela ausência ou disfunção da distrofina (PALMIERI et al., 1996; HOWEL et al., 1997).

Mutações genéticas levam à deficiência da distrofina, uma proteína associada ao sarcolema dos músculos lisos, cardíacos e esquelético, que ajuda a manter a integridade da membrana durante o processo de contração e relaxamento muscular. (PALMIERI et al., 1996; BERGMAN et al., 2002). Esses indivíduos afetados pela distrofia apresentam alterações significantes no organismo quando comparados com a população normal (PALMIERI et al., 1996).

Geneticamente homólogos aos DMD são os cães Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), sendo, então, o melhor modelo utilizado para análises pré clínicas (Golden Retriever Muscular Dystrophy - GRMD) compartilhando seu quadro de miopatia severa e desenvolvimento clínico letal (HAINSEY et al., 2003; VAINZOF et al., 2008, AMBRÓSIO et al., 2009). As semelhanças clínicas na evolução e gravidade da distrofia entre humanos com DMD e o modelo GRMD, justificam seu uso como modelo de estudo para os mecanismos que possam contribuir para a lesão em músculos distróficos e, mais importante ainda, para os fatores que lidam com a regeneração (CHILDERS, 2001).

Galeno foi o autor da primeira citação da tireóide, no século II d.C., descrevendo a cartilagem que recobre a laringe, denominada kóndros thyreoidés (de thyreós, escudo e eidés, semelhante a), mas não a glândula. Posteriormente, Vesalius dissecou e identificou esta glândula, mas foi Thomas Warthon quem a nomeou como glândula tireóide e a redescreveu em 1646, no livro *Adenographia*. Assim a denominou não por sua forma, mas sim por sua localização topográfica junto a cartilagem descrita por Galeno (*ad latera cartilaginum thyroids*) (REZENDE, 2004). As principais funções da tireóide são a regulação da taxa metabólica, produção de calor e síntese e liberação de triiodotironina (T₃) e tetraiodotironina ou tiroxina (T₄) (FELDMAN; NELSON, 2004). Juntamente com o hormônio do crescimento, os hormônios tireoideanos são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento normais (CUNNINGHAM, 2004).

Na década de 30, Hans Selye realizou pesquisas sobre os efeitos das adrenalectomia e a capacidade animal em defender-se das injúrias causadas por cirurgias. Em função disto, a função do córtex da adrenal despertou interesse entre os pesquisadores (CUNNINGHAM, 2004).

Ao longo dos últimos 30 anos a medicina nuclear imaginou as lesões da glândula adrenal derivadas da exploração de características fisiológicas associadas com este órgão. Buscando recursos isto foi quantitativa ou qualitativamente diferente do imaginado a respeito dos tecidos adjacentes devido às características funcionais das glândulas adrenais em associação a doenças (COYNE, 2006).

Uma das principais características da distrofia muscular progressiva que os GRMD apresentam (CAROMANO, 1999; SOUZA; MELO, 2000) e do hiperadrenocorticismismo é a redução da contratilidade e volume da musculatura esquelética (KIRK; MULLER; SCOTT, 1985).

Nos cães, o hiperadrenocorticismismo atua alterando o estado da tireóide, diminuindo os níveis de T₄ total e no T₃ total que são causadas pela síndrome do eutireóideo doente ou através de uma resposta ao estímulo do hormônio tireotrópico ou tireotropina (TSH) que é atenuada como resultado da inundação dos tireotrofos hipofisários pelos adrenocorticotrofos (CUNNINGHAM, 2004).

Danowski et al. (1956a, 1956b) e Mularek e Gembicki (1966) reportaram que distúrbios na função da tireóide pode ocorrer juntamente com progressivas distrofias

musculares. O estado da tireóide é diretamente afetado pelos hormônios adrenais (CUNNINGHAM, 2004), portanto faz-se importante o estudo destes hormônios e das estruturas que os secretam.

Para a avaliação de possíveis interferências destes hormônios (T_3 , T_4 , TSH e cortisol) na evolução do quadro da distrofia muscular, as glândulas relacionadas, adrenais e tireóides, de cão controle e de GRMD, assim como seus hormônios foram analisados.

O estudo proposto teve como objetivo analisar a morfologia das glândulas endócrinas adrenais e tireóide de cães afetados pela distrofia muscular e compará-las às glândulas de cão controle, assim como seus respectivos hormônios para a comprovação de normalidade ou alteração na morfofisiologia dessas glândulas, uma vez que estas secretam hormônios essenciais a manutenção de algumas funções vitais as quais podem levar o indivíduo a morte.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi relacionado às glândulas adrenais e tireóide e seus respectivos hormônios.

2.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar as possíveis alterações hormonais e as características morfológicas em microscopia de luz e de eletrônica de transmissão e macroscopia das glândulas tireóide e adrenais dos GRMD na evolução da Distrofia Muscular do cão Golden Retriever.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar macroscopicamente a glândula tireóide de GRMD e de um cão controle;
- Analisar macroscopicamente as glândulas adrenais de GRMD e de um cão controle;
- Analisar microscópicamente a glândula tireóide de GRMD e cães saudáveis;
- Analisar microscópicamente as glândulas adrenais de GRMD e cães saudáveis;
- Avaliar exames hormonais (cortisol, T₃ total, T₄ total, T₄ livre e TSH) realizados, através do radioimunoensaio, de GRMD;
- Avaliar exames hormonais (cortisol, T₃ total, T₄ total, T₄ livre e TSH) realizados, através de radioimunoensaio, de cadelas portadoras do gene da distrofia;
- Avaliar exames hormonais (cortisol, T₃ total, T₄ total, T₄ livre e TSH) realizados, também através de radioimunoensaio de cães Golden Retriever não afetados nem portadores do gene da distrofia;
- Comparar dados obtidos nos três grupos anteriores, de cães aparentemente saudáveis, das portadoras do gene da distrofia e dos afetados.

3 JUSTIFICATIVA

Foram analisadas, histologicamente e macroscopicamente, somente as glândulas tireóide e adrenais dos cães GRMD, pois a glândula hipófise, assim como seu hormônio do crescimento GH (Growth Hormone), já foram analisados neste grupo de animais. As gônadas, todos os órgãos com seus respectivos hormônios, já fazem parte de pesquisas do grupo da mesma instituição.

As tireóides foram estudadas por sintetizarem T_3 total, T_4 total e T_4 livre, pois estes hormônios são responsáveis por controlar taxas de metabolismo do corpo, como aumento da síntese e diminuição da degradação de proteínas mitocondriais e o TSH (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Também foram analisadas as adrenais, pois estas secretam glicocorticóides, tais como o cortisol, o qual, em órgãos periféricos, diminuem a atividade sintética e promovendo a degradação de proteínas e de lipídios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

4 REVISÃO DE LITERATURA

Os tópicos abordados na revisão de literatura são: A Distrofia Muscular de Duchenne; Os modelos para estudo da DMD; A adrenal, a tireóide e seus hormônios; As adrenais e o hormônio cortisol; A tireóide e os hormônios T₃, T₄ e TSH.

4.1 A Distrofia Muscular de Duchenne

As doenças neuromusculares são um grupo heterogêneo de doenças genéticas, causadas por mutações nos genes codificando proteínas musculares sarcolemicas, sarcoméricas, e citosolicas. Deficiências ou perda de função dessas proteínas leva a variável grau de perda progressiva da capacidade motora (VAINZOF et al., 2008).

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) constitui um distúrbio genético, de caráter recessivo, com alta taxa de mutação em um gene localizado no braço curto do cromossomo X, em uma região denominada Xp21 (CAROMANO, 1999; YIU; KORNEBERG, 2008). Trata-se de uma enfermidade letal e progressiva, relacionada a uma mutação no gene responsável pela expressão da proteína distrofina (THOR; TERRYBORRY, 2003). Em 65% ocorre deleção de uma parte do DNA, em 5% duplicação do gene e em 30% dos casos mutação de ponto (CAROMANO, 1999; YIU; KORNEBERG, 2008). Ocorre, principalmente, em pessoas do sexo masculino, sendo que as mulheres são portadoras. Sua incidência é de cerca de um para cada 3500 nascidos vivos do sexo masculino. No Brasil, ocorrem por ano, cerca de 700 novos casos de DMD.

A distrofina é o maior componente do complexo distrofina - glicoproteínas (DGC), no qual liga o citoesqueleto da miofibrila com a matriz extracelular, ajuda a manter a integridade da membrana durante o processo de contração muscular. A ruptura desse complexo causa um aumento da susceptibilidade de lesão induzida

pela contração, e lesão do sarcolema, ocasionando necrose da miofibrila, levando à perda progressiva da massa e função muscular. Embora o defeito na DMD seja conhecido, as funções exatas da distrofina não são totalmente entendidas, e a seqüência de eventos moleculares que lidam para a lesão celular ainda não foi elucidada (TKATCHENKO et al., 2001; CHARGÉ; RUDNICK, 2004; MARQUES, 2004).

Esta miopatia apresenta, como sinais clínicos, a perda progressiva da força muscular, resultando em fraqueza dos músculos respiratórios e cardíacos, sendo que a grande maioria dos pacientes desenvolve cardiomiopatia (CAROMANO, 1999; BIGGAR et al., 2002; BEENAKKER et al., 2005). Assim, o músculo distrófico apresenta variações no tamanho da fibra muscular e acúmulo de núcleos centrais, infiltração de tecido conectivo e adiposo e elevado nível de creatinoquinase (CK) no plasma. Inicialmente, a doença caracteriza-se pela presença de grupos focais de miofibras necróticas e hipertrofia muscular. Na fase patológica, repetidos ciclos de degeneração desgastam a capacidade de regeneração das células satélites, afetando os músculos de forma geral (DECONINCK; DAN, 2007).

De acordo com Kakulas e Mastaglia (1990), é certo que as alterações musculares já ocorrem desde o período fetal, e que durante a infância e adolescência, a necrose está presente em um grau alto em certos grupos musculares dos membros pélvicos e escapulares.

Vainzof e Zatz (2003) relataram que estudos moleculares em indivíduos com distrofias musculares, têm apresentado variabilidade clínica inter e intra-familiar em diferentes desordens genéticas, levantando a importância de outros fatores, que não os genéticos, na determinação da expressão fenotípica.

O diagnóstico de DMD pode ser estabelecido na maioria dos casos, através da história familiar, de achados clínicos, laboratoriais e genéticos (análise de DNA), podendo ser utilizados eventualmente, exames eletrofisiológicos e histológicos. Os níveis enzimáticos, principalmente de creatinofosfoquinase (CPK), biopsia muscular e análise de DNA são amplamente explorados na caracterização da doença (CAROMANO, 1999).

No Brasil, a dificuldade de acesso da população em geral aos testes diagnósticos necessários, exame de DNA, enzimas séricas e biópsia muscular te

atrasado o diagnóstico definitivo e impedido que muitos pais, com filhos afetados, evitem o nascimento de outros filhos com a mesma doença. A partir do diagnóstico definitivo, as crianças devem receber o tratamento de suporte indicado, como a fisioterapia motora e respiratória, hidroterapia, suplementação nutricional e corticoterapia (DEMOS, 1983; RIDEAU, 1985; ANSVED, 2003; GAIAD, 2006).

4.2 Os modelo para estudo da DMD

Modelos animais manifestando o fenótipo foram observados em doenças genéticas específicas que foram identificados na natureza. Também foram gerados geneticamente modelos da distrofia muscular. Esse animais geralmente apresentam alterações fisiológicas frequentemente observadas em pacientes humanos e podem ser usados em estudos genéticos, clínicos e histopatológicos, com grande importância para o entendimento das patogenias. Modelos animais também são importantes para o teste de estratégias terapêuticas (VAINZOF et al., 2008).

As formas de distrofias musculares associadas ao cromossomo X onde há ausência de distrofina foram descritas em humanos e outras espécies, como camundongos *mdx*, cães e gatos (HOFFMAN; GOROSPE, 1991). O camundongo *mdx* é o animal mais utilizado para a DMD. Sua primeira descrição foi em 1984 devido a observação dos altos níveis plasmáticos da creatina quinase e piruvato quinase musculares e lesões histológicas características da distrofia muscular. Embora seja um bom modelo de genética e bioquímica, apresentando deficiência total da proteína distrofina no músculo, este camundongo não é útil para os ensaios clínicos, devido ao seu fenótipo muito leve (VAINZOF et al., 2008), sua estabilidade clínica por apresentar menor degeneração nas fibras musculares, maior regeneração e menos fibrose do que encontrado nos pacientes DMD (PASTORET; SEBILLE, 1995; SHELTON; ENGVALL, 2005). Os felinos com distrofia muscular hipertrófica, denominada HFMD (Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy), é também considerada análoga à DMD, uma vez que ocorre a ausência de distrofina nos músculos (MCKERRELL, 2004).

Numerosos casos esporádicos da distrofia muscular canina (MD) foi reconhecida nas ultimas duas décadas, mas a descrição original do cão Golden Retriever distrófico (GRMD), como modelo para a DMD humana, foi feita por Cooper et al. (1988) no cromossomo X. Além dos cães da raça Golden Retriever, mutações espontâneas do gene da distrofina, têm sido identificadas em outras raças de cães domésticos, como Rottweiler e o Beagle. Entretanto, o GRMD tem sido o modelo animal mais amplamente estudado e o melhor caracterizado. Desde as primeiras descrições, a mutação do gene da distrofina no GRMD tem sido identificada e então, este modelo animal tem sido reconhecido e amplamente utilizado nas avaliações experimentais de novos tratamentos previamente aos estudos clínicos em humanos (COLLINS; MORGAN, 2003; SHELTON; ENGVALL, 2005). Destarte, o modelo com maiores similaridades com os DMD são os cães afetados Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD). Há elevada atividade da creatina quinase, atrofia muscular com contratura, histologicamente necroses musculares, degeneração com mineralização, fibroses endomisial e perimisial, cardiomiopatias e fraqueza (HOWEL et al., 1997; COZZI et al., 2001; VAINZOF et al., 2008).

O cruzamento de cães GRMD de uma fêmea portadora do gene, com um macho afetado gera machos normais, fêmeas heterozigotas e machos e fêmeas afetados (NGUYEN et al., 2002). A patogênese do GRMD se manifesta intra-útero e, de acordo com VALENTINE et al. (1990), as lesões no músculo da língua podem se iniciar ainda nesta fase. A doença pode ser identificada concretamente a partir do nascimento através da dosagem de CK, que se encontra acentuadamente elevada na maioria dos casos, e juntamente por teste genético utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR) (VALENTINE et al., 1990; CHILDERS et al., 2001; 2002).

Tanto os pacientes DMD quanto os animais GRMD, frequentemente, morrem ainda jovens devido a parada cardíaca ou respiratória (NGUYEN et al., 2002) e alguns cães GRMD sobrevivem por mais de seis anos de vida (HOWELL et al., 1997). Os sinais clínicos de progressão da doença dos sobreviventes ocorre entre os três e seis meses de idade (KORNEGAY et al., 1994; COLLINS; MORGAN, 2003) como a regeneração muscular verificável pela imaturidade do tecido muscular, identificada através de imuno- histoquímica (NGUYEN et al., 2002). Com a progressão da doença (fase patológica), repetidos ciclos de degeneração diminuem

a capacidade de regeneração das células satélites e mecanismos fibróticos causam o progressivo depósito de tecido fibroso e colagenoso. Os animais afetados cansam-se com facilidade, desenvolvem marchas alternantes anormais, caracterizadas por passadas rígidas e curtas, podem, ainda apresentar redução na capacidade de abrir os maxilares e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos; a maior parte da musculatura esquelética torna-se atrofica, porém, certos grupos musculares e a língua apresentam-se com hipertrofia (KORNEGAY et al., 1994; NGUYEN et al., 2002).

O perfil da lesão da DMD e dos GRMD se caracteriza por ciclos de degeneração e regeneração das fibras musculares, até a capacidade de regeneração esgotar-se nos estágios mais tardios das doenças, gerando a substituição de tecido muscular íntegro por gordura e tecido fibroso (VALENTINE et al., 1986; CHILDERS et al., 2002; NGUYEN et al., 2002; HULLAND, 2003). A lesão da miofibrila sem uma total recuperação tanto nas crianças quanto no modelo canino GRMD, resultam em fibroses, contraturas e fraqueza (CHILDERS et al., 2002).

Os cães e humanos afetados pela distrofia muscular apresentam, como sinais clínicos, a perda progressiva da força muscular, que ocorre gradualmente e de forma ascendente, simétrica e bilateral, com início na cintura pélvica e membros inferiores, progredindo para musculatura de tronco e para a musculatura responsável pela sustentação da postura bípede, cintura escapular, membros superiores, pescoço (CAROMANO, 1999; SOUZA; MELO, 2000). Os estudos *in vivo* da musculatura pélvica demonstram que cachorros com distrofia muscular são mais fracos que os cachorros normais em todas as idades (CHILDERS et al., 2001) ambos apresentam comprometimento da função respiratória, resultando em aumento da frequência respiratória (SHELTON; ENGVALL, 2005). Frequentemente, esses animais morrem de falência cardio-respiratória, embora possam alcançar muitos anos de vida (BIGGAR et al., 2002).

Ocorrem também alterações na musculatura cardíaca e diafragmática através da mutação no gene da proteína distrofina na superfície da membrana da célula muscular (HOWEL et al., 1997; COZZI et al., 2001; VAINZOF et al., 2008). Frequentemente, esses animais morrem de falência cardio-respiratória, embora

possam alcançar muitos anos de vida (BIGGAR et al., 2002). Adicionalmente, outros sistemas de órgãos musculares e não musculares também podem estar alterados em humanos e animais distróficos. Estudos realizados discorreram sobre aumentos de tensão observados na veia porta hepática, bem como flacidez da parede da vesícula biliar ocasionada pela ausência do gene da distrofina em camundongos *mdx*. Além disso, também relataram síndrome de má absorção e processos diarréicos atribuídos à disfunção pancreática em humanos (NOWAK; IONASESCU; ANURAS, 1982; BAROHN, 1988; MIYATAKE et al., 1989; MORIUCHI et al., 1991; BERRY; GASCHEN, ACKERMAN, 1992; BRAZEAU; MATHEW; ENTRIKIN, 1992; STEIN; TIPNIS; SCHULTZ, 2002; GRANDO et al., 2009).

Dentre os achados de Gatti (2007), há diferenças no volume urinário entre cães afetados, cadelas portadoras e cães normais, sendo que o grupo dos afetados possuem média de volume significativamente maior que os animais controles, sendo que ambos os grupos possuem a média deste volume superior ao das fêmeas portadoras. Gatti (2007) relatou também uma diminuição da concentração de creatinina na urina dos cães GRMD quando comparados com o controle e com as fêmeas portadoras, sendo que a média de concentração das portadoras é ainda maior que os animais controle deste estudo. Este alto nível de diurese, apresentada pelos GRMD, possivelmente se deve a dificuldade na manutenção da omeostase hídrica (GATTI, 2007).

Lima et al. (2007) analisou níveis de excreção de GH em cães distróficos e sadios a partir da mensuração do Fator de Crescimento do tipo Insulina I (IGF-I) e concluiu que suas concentrações séricas apresentaram aumento progressivo nos cães distróficos e não distróficos até o terceiro mês de vida. O decréscimo nos níveis de IGF-I em cães sadios ocorreu a partir do sétimo mês, enquanto que nos cães afetados pela distrofia muscular ocorreu a partir do terceiro mês de vida, sendo assim, os cães sadios apresentam maior taxa de crescimento do que os cães afetados.

Brazeau, Mathew e Entrikin (1992) relataram em seu estudo para a avaliação da eficácia de uma determinada droga que seria utilizada no tratamento das distrofias, que os camundongos *mdx* estudados apresentaram indícios de disfunção hepática e renal baseados nas alterações séricas encontradas nos exames

bioquímicos, bem como durante a necropsia, pela diferença de peso dos órgãos em comparação aos órgãos de animais normais. Além desses autores, outros também relatam alterações em órgãos internos de humanos e animais distróficos (BAROHN et al., 1988; MORIUCHI et al., 1991; MUSCATELLI et al., 1994; GRANDO et al., 2009).

As semelhanças clínicas na evolução e gravidade da distrofia entre humanos com DMD e o modelo GRMD, justificam seu uso como modelo de estudo para os mecanismos que contribuem para a lesão em músculos distróficos e, mais importante ainda, para os fatores que lidam com a regeneração (CHILDERS et al., 2001).

Quanto ao tratamento de manutenção, principalmente de fisioterapia, a literatura científica, ainda que escassa, recomenda diferentes programas de exercício para as distrofias musculares e, aquelas encontradas, sugerem um efeito benéfico da atividade física para a DMD, principalmente naqueles com alterações mínimas da função muscular (DEMOS, 1983; RIDEAU, 1985; VIGNOS et al., 1996; ANSVED, 2003).

4.3 A adrenal, a tireóide e seus hormônios

Hormônios são moléculas que funcionam no organismo como sinais químicos. Eles são liberados por células especializadas chamadas células endócrinas, pois elas secretam para o interior do organismo. Células endócrinas comumente se unem formando glândulas endócrinas, onde se organizam, geralmente, sob forma de cordões celulares. Uma exceção notável é a glândula tireóide, cujas células são organizadas como pequenas esferas, chamadas folículos. As células endócrinas estão sempre muito próximas de capilares sanguíneos, que recebem hormônios secretados e os distribuem, pelo organismo, diluídos no plasma. Muitos hormônios, portanto, agem distantes do seu local de secreção. Os tecidos e órgãos nos quais os hormônios atuam são chamados tecidos- alvo ou órgãos- alvo. Estes reagem aos hormônios porque as suas células têm receptores que reconhecem especificamente

determinados hormônios e só a eles respondem. Por causa disso os hormônios podem circular no sangue sem influenciar indiscriminadamente todas as células do corpo. Outra vantagem da existência de receptores é a capacidade de resposta das células- alvo aos respectivos hormônios mesmo se estes estiverem presentes no sangue em concentrações muito pequenas, o que normalmente acontece. As próprias células endócrinas também podem ser células- alvo de outras glândulas endócrinas. Deste modo, o organismo pode controlar a secreção de hormônios por um mecanismo de retroalimentação (*feedback*) e manter níveis hormonais plasmáticos adequados dentro de limites muito precisos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

4.3.1 As adrenais e o hormônio cortisol

As adrenais ou supra- renais são duas glândulas achatadas com formato de meia-lua, cada uma situada sobre o pólo cranial de cada rim. O tamanho das adrenais varia com a idade e com as condições fisiológicas do indivíduo. As glândulas adrenais caninas estão contidas em uma cápsula de tecido conjuntivo denso (BANKS, 1992, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), são altamente vascularizadas, sendo que as principais artérias se ramificam antes de penetrar na glândula, originando numerosas arteríolas. Vasos linfáticos e nervos, principalmente do sistema nervoso autônomo simpático, são estruturas encontradas nas adrenais (BANKS, 1992). Cortando-se o órgão fresco, nota-se que ele é dividido nitidamente em duas camadas concêntricas: uma periférica, de cor amarelada, denominada camada cortical ou córtex da adrenal, e outra central, acinzentada, a camada medular ou medula da adrenal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). As duas partes distintas que se diferem morfológicamente, funcionalmente e ainda por sua origem embrionária onde o córtex adrenal desenvolve-se a partir do epitélio celômico que tem origem mesodérmica e a medular deriva do ectoderma da crista neural (CUNNINGHAM, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MCGAVIN; ZACHARY, 2009).

Em cães, o córtex da adrenal é firme, amarelo e de espessura quase uniforme (MCGAVIN; ZACHARY, 2009). O córtex adrenal produz hormônios esteróides como o cortisol (CUNNINGHAM, 2004) e pode ser subdivididos em três camadas concêntricas cujos limites nem sempre são perfeitamente definidos: a zona glomerular, a zona fasciculada e a zona reticulada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Berry, Gaschen e Ackerman (1992) encontraram alterações radiográficas e ultra-sonográficas em vários órgãos de felinos com distrofia muscular hipertrófica, denominada HFMD (Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy), também considerada análoga à DMD e GRMD, uma vez que ocorre a ausência de distrofina nos músculos (MCKERRELL, 2004). Relataram ainda as seguintes alterações: mineralização das glândulas adrenais, hepatomegalia, esplenomegalia, renomegalia, efusão peritoneal, espessamento da porção muscular do diafragma, hipocogenicidade do parênquima hepático e hiperecogenicidade da cortical e medular renal (CARPENTER et al. 1989; BERRY; GASCHEN; ACKERMAN, 1992).

Embora Muscatelli et al. (1994) e Pillers et al. (1990) relatem a possibilidade da hipoplasia congênita da glândula adrenal em pacientes DMD e Berry, Gaschen e Ackerman (1992) e Carpenter et al. (1989) tenham observado a presença de mineralização das glândulas adrenais em dois felinos distróficos, Grando et al. (2009), detectou esta alteração apenas em um cão GRMD adulto afetado, que apresentava alteração na glândula adrenal direita (medindo 4,1 x 2,1cm).

Do ponto de vista microscópico e funcional as glândulas adrenais dos mamíferos como apresentando três camadas que formam o córtex da adrenal: a zona glomerular, adjacente à cápsula, que é composta por cordões de células com disposição sigmóide ou em arco; as células da zona fasciculada, zona intermediária, são dispostas em longos cordões anastomosados, separados por grande número de capilares. A zona fasciculada é a responsável pela secreção dos hormônios glicocorticóides, como o cortisol. A zona reticulada possui células secretoras arranjadas em pequenos grupos rodeados por capilares (BANKS, 1992; CUNNINGHAM, 2004; MCGAVIN; ZACHARY, 2009). A medula da adrenal, nos mamíferos, é completamente envolvida pelo córtex da adrenal e é composta por

células arranjadas em pequenos grupos, com formato oval, separados por tecido conectivo e vasos sanguíneos (ADAM; DAWBORN; ROSENBAUM, 1970).

Os esteróides secretados pelo córtex podem ser divididos em três grupos, de acordo com suas ações fisiológicas principais: glicocorticóides, mineralcorticóides e andrógenos. A zona glomerulosa secreta mineralcorticóides. A zona fasciculada e provavelmente a zona reticulada secretam os glicocorticóides cortisona e cortisol ou, em alguns animais, corticosterona; estes glicocorticóides regulam o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (GEORGE; ALVES; CASTRO, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; COYNE, 2006).

O hormônio corticotrofina promove a liberação do hormônio adrenocorticotrófico hipófise (ACTH) que por sua vez promove a síntese e liberação do cortisol pelo córtex da adrenal (COYNE, 2006).

Os glicocorticóides, principalmente o cortisol, tem um efeito profundo no metabolismo de carboidratos, como também no de proteínas e lipídios. No fígado, os glicocorticóides promovem a retirada de ácidos graxos, aminoácidos e carboidratos do sangue, causando acúmulo de fontes de energia, síntese de proteínas e síntese de glicose pelos hepatócitos. Os glicocorticóides também estimulam a síntese de glicogênio a partir de precursores não- glicídicos, um processo chamado gliconeogênese, assim como a polimerização de moléculas de glicose em glicogênio, denominada glicogênese. Em órgãos periféricos, produzem efeito oposto, catabólico, diminuindo a atividade sintética e promovendo a degradação de proteínas e de lipídios. Os glicocorticóides também suprimem a resposta imune destruindo linfócitos circulantes e inibindo a atividade mitótica em órgãos formadores de linfócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As propriedades antiinflamatórias dos glicocorticóides, principalmente do cortisol, são funções importantes de estabilização das membranas lisossômicas, diminuindo a síntese de colágeno, aumentam assim a degradação do colágeno, inibindo a proliferação de fibroblastos (BANKS, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), suprimindo as citocinas e também têm ação imunossupressora (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O hiperadrenocortiscismo é um distúrbio do cão, associada com taxa excessivas de glicocorticóides endógenos ou exógenos, caracterizada por poliúria e

polidipsia; alopecia simétrica bilateral; pele adelgada e hipotônica; redução da musculatura esquelética (KIRK; MULLER; SCOTT, 1985). Esta alteração na excreção de glicocorticóides através da adrenal é caracterizada por poliúria e polidipsia; alopecia simétrica bilateral; pele adelgada e hipotônica; redução da musculatura esquelética (KIRK; MULLER; SCOTT, 1985), diminuição na densidade da urina e proteinúria resultante de glomerulosclerose (CUNNINGHAM, 2004). Os glicocorticóides desempenham função de aumento da diurese aquosa, aumentando a taxa de filtração glomerular (CUNNINGHAM, 2004).

Johansson et al. (2000) demonstrou, em pacientes com excesso de tecido adiposo e com a distrofia miotônica, que o ritmo diurno do cortisol sérico é aumentado devido ao aumento da concentração plasmática de citocinas séricas. A distrofia miotônica também é uma doença neuromuscular, autossômica dominante, que afeta a musculatura esquelética, cardíaca e lisa, assim como os olhos e o sistema endócrino de humanos (HARPER, 1989; ROWLAND, 2000).

4.3.2 A tireóide e os hormônios T_3 , T_4 e TSH

A tireóide é uma glândula endócrina de origem endodérmica que se desenvolve precocemente na porção cefálica do tubo digestório (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Ela exerce funções desde a vida fetal (SCHEUNERT; TRAUTMANN; KRZYWANIEK, 1942) e sua principal função é sintetizar os hormônios tireoideanos tetraiodotironina ou tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3), que controlam a taxa de metabolismo do corpo, mantendo crescimento e desenvolvimento normal, bem como a temperatura corporal e os níveis energéticos dentro de sua taxa normal (KATZUNG, 2006).

Na maioria dos mamíferos, a glândula tireóide está localizada caudalmente à traquéia ao nível do primeiro ao segundo anel traqueal (CUNNINGHAM, 2004) até o nono anel traqueal (DONE et al., 2009). A glândula tireóide é constituída de dois lobos situados cada um de um lado da traquéia e unidos por uma estreita porção de tecido denominada istmo (CUNNINGHAM, 2004). Estas glândulas são

vascularizadas pelas artérias tireóideas cranial e caudal (ramos da artéria carótida comum). A drenagem venosa ocorre pelas veias tireóideas cranial e caudal, que desembocam na veia jugular interna (VENZKE, 1981; SCAVELLI; PETERSON, 1998). A drenagem linfática é função dos linfonodos cervicais retrofaríngeos (CAPEN, 1993) e as fibras nervosas simpáticas derivadas do gânglio cervical dorsal e do nervo laríngeo dorsal são responsáveis pela sua inervação (VENZKE, 1981). Não é possível realizar a palpação da glândula tireóide no cão saudável (DONE et al., 2009).

Microscopicamente, a glândula é composta por milhares de folículos tireoideanos, que são pequenas esferas. Os folículos são formados por epitélio simples e a sua cavidade contém uma substância gelatinosa homogênea chamada colóide. Em cortes, as células dos folículos variam de cubóides quando a secreção é basal a alongadas quando as células são estimuladas a liberar hormônios e os folículos mostram diâmetros muito variáveis (CUNNINGHAM, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Estas células possuem um extenso retículo endoplasmático para a síntese e um grande complexo de Golgi, em posição supranuclear, para o condicionamento de quantidades substanciais de proteínas que, posteriormente, são transportadas ao lúmen dos folículos denominado colóide (BANKS, 1992; MCGAVIN; ZACHARY, 2009). O colóide que contém proteínas, glicoproteínas e enzimas, geralmente, é acidófilo e, portanto PAS positivas (BANKS, 1992).

A glândula é coberta por uma camada de tecido conjuntivo frouxo que envia septos para o parênquima. A tireóide é um órgão extremamente vascularizado por uma extensa parede capilar sanguínea e linfática que cerca os folículos. As células epiteliais dos folículos tireoideanos se apóiam sobre uma lâmina basal e exibem todas as características de células que simultaneamente sintetizam, secretam, absorvem e digerem proteínas (BANKS, 1992; CUNNINGHAM, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MCGAVIN; ZACHARY, 2009). Um hormônio importante para a regulação do cálcio é a calcitocina, secretada por outra célula endócrina importante, a célula C ou célula parafolicular, a qual localiza-se fora dos folículos (CUNNINGHAM, 2004).

A tireóide é a única glândula endócrina que acumula grande parte de seu produto ativo de secreção em quantidade apreciável fora das células foliculares.

Esse acúmulo é chamado de colóide, que localiza-se no lúmen ou ácinos formados pelo arranjo circular de células glandulares (CUNNINGHAM, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A tirosina e o iodo são as duas principais moléculas que formam os hormônios tireoideanos. A tirosina é parte de uma grande molécula, a tireoglobulina a qual forma-se na célula folicular e, em seguida, é secretada para o lúmen. O iodo é convertido em iodeto no trato intestinal, então é transportado para a tireóide, local em que as células foliculares o capturam através do transporte ativo. Sendo assim, as concentrações intracelulares são de 25 a 200 vezes maiores do que as concentrações extracelulares (CUNNINGHAM, 2004).

O iodeto, passando pela parede apical celular, liga-se às estruturas anelares das moléculas de tirosina, que fazem parte da seqüência de aminoácidos que formam a tireoglobulina. O anel tirosil pode receber até duas moléculas de iodeto; se somente uma se acopla, é chamado de moniodotirosina e se duas moléculas de iodeto se acoplarem, então é chamado de diiodotirosina. A junção de duas moléculas de tirosina iodadas resultam na formação dos principais hormônios tireóideos; duas moléculas de diiodotirosina formam a tetraiodotironina (T_4) e uma molécula de moniodotirosina com uma de diiodotirosina formam a triiodotironina (T_3). A maior parte da formação de T_3 ocorre fora da tireóide pela desiodação do T_4 . Os tecidos que têm alta concentração de enzimas desiodantes são o fígado e os rins, embora o tecido muscular produza mais T_3 devido ao seu tamanho (CUNNINGHAM, 2004; KATZUNG, 2006).

Do ponto de vista teleológico, os hormônios tireoideanos são os mais importantes do metabolismo; ele permite aos mamíferos ficarem privados de iodo por algum tempo sem que haja efeitos imediatos sobre a produção de hormônios tireóideos. Isto se deve pelo fato de haver o armazenamento de hormônios no colóide (CUNNINGHAM, 2004). O iodo corresponde a 59% do T_3 e 65% do T_4 em humanos (KATZUNG, 2006).

A ingestão diária recomendada de iodeto para adultos humanos é de 150 μg (200 μg durante a gravidez). O iodeto ingerido nos alimentos, água ou medicamentos é rapidamente absorvido e armazenado (KATZUNG, 2006).

Os hormônios tireóideos são importantes para a atividade normal de todos os tecidos. Aumentam a frequência cardíaca e a força de contração, provavelmente devido sua interação com as catecolaminas, sendo assim, a diminuição da concentração de seus hormônios causa bradicardia e diminuição da contratilidade cardíaca (CUNNINGHAM, 2004). Os sistemas nervosos e esqueléticos, especialmente, apresentam alterações de crescimento e do desenvolvimento, na ausência dos hormônios tireóideos (BANKS, 1992).

O principal mecanismo regulador do estado estrutural e funcional da glândula é o hormônio tireotrópico (TSH ou tireotropina), secretado pela hipófise. A análise de TSH pode ser aplicada para avaliar a função tireoideana sobre diversos fatores fisiológicos. Quando estimuladas pela tireotropina, as células foliculares da tireóide captam colóide por meio de endocitose. As moléculas de globulina ligadora de tiroxina (TGB) são então digeridas por enzimas lisossômicas, as ligações entre radicais iodinados e a molécula de tireoglobulina são quebradas por proteases e T_4 , T_3 , diiodotirosina e monoiodotirosina são liberadas no citoplasma. O T_4 e o T_3 cruzam livremente a membrana baso- lateral da célula e se difundem até os capilares sanguíneos. T_4 é mais abundante, constituindo cerca de 90% do hormônio circulante da tireóide, porém T_3 exerce sua função mais rapidamente e é mais potente (CUNNINGHAM, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; COYNE, 2006; KATZUNG, 2006).

Os hormônios tireoideanos são lipossolúveis, sendo assim, são transportados no plasma, ligados a proteínas, sendo que a principal proteína transportadora é a TGB, que tem alta afinidade por T_4 . A albumina e a pré-albumina também exercem o papel de transporte. Como a maior parte dos hormônios T_3 e T_4 está ligada, uma pequena quantidade está livre para se ligarem aos receptores dos tecidos- alvo. A quantidade de hormônio livre no plasma é relativamente baixa: em humanos 0,03% de T_4 e 0,3 de T_3 , em cães um pouco menos de 1,0% de T_4 e levemente maior que 1,0% de T_3 . Isto se deve à menor afinidade entre as proteínas ligadoras plasmáticas e os hormônios tireóideos no plasma de cães do que no plasma de humanos (CUNNINGHAM, 2004).

A tiroxina tem um efeito gradual no organismo, estimulando a oxidação fosforilativa nas mitocôndrias, efeito dependente de síntese de mRNA. T_3 e T_4

aumentam o número de mitocôndrias e de suas cristas. Há também aumento da síntese e diminuição da degradação de proteínas mitocondriais. A maioria dos efeitos de hormônios tireoideanos é resultado da sua ação na taxa de metabolismo basal; eles aumentam a absorção de carboidratos no intestino e regulam o metabolismo de lipídios; também influenciam o crescimento do corpo e o desenvolvimento do sistema nervoso durante a vida fetal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). No interior das mitocôndrias ocorre o efeito calorigênico causado pelos hormônios tireoideanos, efeito este que com o aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos, há também a elevação da produção de calor. Estes hormônios também afetam o metabolismo dos carboidratos, aumentando a absorção intestinal de glicose e facilitando a entrada da glicose nas células adiposas e musculares; modificam também o metabolismo de lipídios, proteínas, vitaminas e de drogas (CUNNINGHAM, 2004; KATZUNG, 2006). Muitas das alterações corpóreas dependem também da atividade de outros hormônios ou são modificadas por eles. Por outro lado, as taxas de secreção e degradação de praticamente todos os outros hormônios, dentre eles o cortisol, são afetadas pelo estado da tireóide (KATZUNG, 2006).

Com relação a secreção hormonal pela tireóide, efeitos clínicos relacionados ao hipotireoidismo incluem desigualdade na perfusão da ventilação, redução da capacidade de difusão do oxigênio no interior do pulmão, redução da permeabilidade capilar, anemia, cardiomiopatia e depressão geral do sistema nervoso central (HUNTER, 1980; KLEIN; LEVEY, 1984). Hormônios da tireóide influenciam também as características funcionais do músculo respiratório (diafragma). Pesquisas relatam que há a capacidade de transdução de energia com a diminuição do volume corrente, diminuindo a ventilação através do diafragma do rato com hipotireoidismo (SCHLENKER; BURBACH, 1991).

A deficiência na tireóide causa redução da musculatura esquelética observada com a marcação de enzimas respiratórias e através da capacidade das mitocôndrias em oxidar o malte piruvato, succinato e o glutamato (GUSTAFSON et al., 1965), embora o rendimento das mitocôndrias sejam similares em músculos normais e tireóide deficientes (GOLLNICK; IANUZZO, 1972). Devido aos substratos, citados acima, serem modificados em diferentes graus resultando na alteração da

composição mitocondrial, pode ser importante na alteração da capacidade respiratória do músculo esquelético (BALDWIN et al., 1980). Em estudo realizado por Baldwin et al. (1980) envolvendo ratos com deficiência na tireóide, foi observado diminuição acentuada na capacidade em oxidar o piruvato e o palmitato em todos os músculos esqueléticos estudados quando comparados a ratos controle, concluindo que a deficiência na tireóide prejudica o processo metabólico oxidativo no músculo esquelético.

Os níveis baixos de hormônios tireóideos, ou hipotireoidismo, é comum na espécie canina. O Golden Retriever é uma das raças que apresentam predisposição e, as raças de alto risco, manifestam sintomas em idade adulta mais avançada (CUNNINGHAM, 2004).

A síndrome do eutireóideo doente é caracterizada pela diminuição da T_4 total sérica e aumento na T_3 . Para diagnóstico de doenças da tireóide em cães avalia-se T_4T e TSH inicialmente, seguido de T_4L sanguíneo para diagnóstico de hipotireóideo, se todas as medidas forem anormais, trata-se desta doença. Se somente duas das medidas forem anormais, a doença pode estar relacionada com hipotireoidismo secundário, com baixos T_4L e TSH, ou hipotireoidismo primário precoce, com alto TSH e baixo T_4L . A T_4 livre não é sujeita a alterações espontâneas ou induzidas por drogas, como ocorre com a T_4 total, sendo assim, cães com hipotireoidismo são identificados com base nos testes de estimulação do TSH e T_4 livre (CUNNINGHAM, 2004).

Com a relação entre TSH e hormônios tireóideos tornou-se possível a avaliação do eixo hipófise-tireóide em cães, sem ensaios dinâmicos. Com a insuficiência da tireóide, as diminuições de T_4 Total (T_4T) e T_4 Livre (T_4L) séricas são percebidas pela hipófise, resultando em aumento na concentração de TSH endógeno sérico (CUNNINGHAM, 2004).

5 MATERIAL E MÉTODO

O projeto proposto foi conduzido após aprovação pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

5.1 Coleta das glândulas

Utilizou-se, para o estudo, as glândulas adrenais e tireóides de sete cães sendo: uma fêmea portadora do gene da distrofia muscular com idade de dois meses (3H2), quatro machos afetados pela distrofia muscular em diferentes faixas etárias: dois (3H4), seis (4B4) e nove meses (2K11) e 6 anos (M5), respectivamente e dois machos aparentemente saudáveis controles: um com dois meses (3H9) e outros com 5 anos de idade (1S).

As glândulas dos três animais com dois meses de idade (3H2, 3H4 e 3H9) encontravam-se fixadas “in situ” em formol 10% no banco de dados do canil GRMD-Brasil. Aparentemente, estas glândulas apresentavam bom estado de conservação, mas não dispunham de conservação para a análise histológica, portanto não foram utilizadas. As tireóides e adrenais dos outros animais foram coletadas a fresco e devidamente fixadas, tornando viáveis as análises.

Para coleta das glândulas adrenais dos cães, os animais foram devidamente posicionados em decúbito ventral e fez-se uma incisão longitudinal central no abdome, expondo as vísceras abdominais e o material desejado foi devidamente removido.

Para a coleta da glândula Tireóide, o animal foi posicionamento em decúbito ventral e fez-se uma incisão longitudinal na região do pescoço, a fim de expor a traquéia e a glândula (Figura 1).

Figura 1 - Fotografia da incisão longitudinal na região de pescoço de uma fêmea portadora da Distrofia Muscular (3H2). Observa-se: tela subcutânea (**p**), veia jugular externa (**vj**), músculo esquelético esterno-hióideo (**m**) e traquéia (**tr**)

5.2 Análise macroscópica

Para análise macroscópica as glândulas de secreção hormonal adrenais e tireóide foram fotografadas (máquina Sony Super Steady Shot DSC-W80, 7.2 mega pixels) “in situ” e após remoção, foram devidamente medidas com paquímetro e pesadas em balança de precisão (Marte® AL500) para comparações.

5.3 Análise Microscópica

Para caracterização estrutural das glândulas caninas, em microscopia de luz, foi feito corte transversal no centro de cada glândula e metade, com cerca de 0,5 cm², do material que já estava fixado continuou armazenado em formol 10% e metade do material coletado a fresco foi fixado em paraformaldeído 4%.

O glutaraldeído 2,5% tamponado com fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,4 é o fixador utilizado na Microscopia Eletrônica de transmissão. Tem um baixo poder de penetração nos tecidos animais, assim, todo o restante do material foi cortado em pequenos fragmentos, aproximadamente 1mm de espessura, para uma fixação adequada e homogênea.

5.3.1 Processamento das amostras para microscopia de luz

Após a fixação, o material foi lavado em PBS “overnight” para que fosse retirado o excesso de paraformol. Ao centro de cada amostra foi feito um corte transversal e em seguida, foi feita a desidratação passando por soluções alcoólicas 70%, 90% e 100%, o material foi deixado em cada solução por 1 hora. O álcool 100% foi trocado mais duas vezes, sendo que o material permaneceu mais uma hora em cada troca. A diafanização foi concluída passando o material para o xilol I e xilol II, 30 minutos em cada solução.

Após fixação e diafanização, os materiais foram emblocados em parafina (Histotec®). Em cada etapa, foi retirada a solução anterior e adicionada a próxima. O material foi inserido na parafina I dentro da estufa a 65° C durante uma hora. Ainda dentro da estufa, a solução I foi substituída pela parafina II por mais uma hora.

O bloco foi submetido a microtomia em micrótomo automático (Leica, RM2165) obtendo-se cortes de aproximadamente 5 µm. Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60 °C.

As tiras de corte foram inseridas em banho maria (de 36° C a 38° C) para serem esticadas e resgatadas com as lâminas previamente identificadas.

Para a análise de microscopia eletrônica o material foi colocado em placas de metal organizadas de modo que formassem um quadrado de tamanho necessário para inserir a amostra. Foi inserida a parafina no quadrado. A amostra foi molhada na parafina, de modo que não fosse visível “crostas” ao seu redor, e inserida no fundo do quadrado de metal com a superfície em que foi feito o corte transversal voltada para baixo.

O material foi identificado inserindo uma das faces de um retângulo de papel na superfície do quadrado de parafina.

Retirou-se o excesso de parafina da porção em que os cortes saíram (na parte inferior do quadrado de metal, onde o material foi colocado e os cortes dos blocos foram feitos sempre no mesmo sentido.

Os cortes, após serem incluídos em parafina, foram corados seguindo as técnicas de HE, P.A.S. e Tricrômio de Masson .

5.3.1.1 Coloração: hematoxilina-eosina (HE)

A hematoxilina-eosina é utilizada para corar células em geral, onde em azul coram-se os núcleos e o cálcio, em rosa o citoplasma, em vermelho as hemácias e granulações eosinófilas e em azul as mucoproteínas.

Método de coloração:

As lâminas foram colocadas em estufa a 60° C por meia hora. Passaram por uma bateria de coloração de HE, permanecendo em Xilol I e Xilol II respectivamente, por 10 minutos em cada solução.

O material foi inserido em álcool absoluto, álcool 95%, álcool 70% respectivamente, por três minutos em cada solução. Em seguida, as lâminas

permaneceram em água de torneira por três minutos, em hematoxilina por aproximadamente cinco minutos e novamente por água de torneira por 10 segundos.

As lâminas passaram rapidamente por álcool ácido e novamente por água de torneira por 10 minutos. Em seguida, foram dados três banhos em água destilada. Por aproximadamente um minuto, as lâminas permaneceram em solução de eosina. Passaram rapidamente pelo álcool 95%, dois banhos em álcool absoluto, mais dois minutos neste mesmo álcool, dois minutos em álcool xilol e, finalmente, dois minutos em xilol.

As lâminas foram montadas secando ao redor do material inserido nas lâminas. Foram colocadas duas gotas de Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA) sobre o material e a lamínula foi inserida, sendo solta a 30° da lâmina para evitar a formação de bolhas e, finalmente, apertou-se a lamínula sobre a lâmina para retirar as bolhas que se formaram.

O material foi processado, corado e analisado e as características morfológicas encontradas foram foto documentadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

5.3.1.2 Coloração: Ácido Periódico de Schiff (PAS)

O resultado de PAS positivo é a intensidade de coloração que varia de vermelho a rosa das estruturas que contêm porções de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína, mucoproteínas, proteoglicanos), tipicamente encontradas em tecido conjuntivo, muco e lâminas basais.

Método de coloração:

As lâminas foram colocadas em estufa a 60° C por meia hora. Passaram por uma bateria de coloração de PAS permanecendo em xilol I, xilol II, álcool absoluto (100%), álcool 90%, álcool 70% e água destilada respectivamente, por 5 minutos em cada solução. Em seguida, o material permaneceu no ácido periódico por 10 minutos, em água destilada por cinco minutos, pelo reativo de Shift por 20 minutos,

novamente por água destilada por dez minutos, pela hematoxilina de Harris por cinco minutos e, finalmente, em água destilada por cinco minutos.

Foi feita uma desidratação alcoólica passando o material pelo álcool 90% e duas vezes pelo álcool absoluto (100%) cinco minutos em cada solução. Por último, as lâminas foram inseridas no xilol I e xilol II, cinco minutos em cada.

As lâminas foram montadas secando ao redor do material inserido nas lâminas. Foram colocadas duas gotas de Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA) sobre o material e a lamínula foi inserida, sendo solta a 30° da lâmina para evitar a formação de bolhas e, finalmente, apertou-se a lamínula sobre a lâmina para retirar as bolhas que se formaram.

O material foi processado, corado e analisado e as características morfológicas encontradas foram foto documentadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

5.3.1.3 Coloração: Tricromio de Masson

A coloração Tricromio de Masson cora em vermelho o citoplasma celular, queratina, fibras musculares, fibras intracelulares, fibrina e axônio não mielinizado, cora em azul ou verde as fibras colágenas e osso e colore em azul ou violeta o núcleo.

Método de coloração:

As lâminas foram colocadas em estufa a 60° C por meia hora. Passaram por uma bateria de coloração de Tricromio de Masson permanecendo em xilol I e xilol II respectivamente, por 5 minutos em cada solução.

O material foi inserido em álcool absoluto (100%), álcool 90%, álcool 70%, água destilada, hematoxilina férrica e água corrente respectivamente, por cinco minutos em cada solução. Em seguida, as glândulas foram deixadas em Solução A por 10 minutos, em água destilada por cinco minutos, em Solução B e C por oito minutos em cada, novamente foi inserida em água destilada por cinco minutos.

Houve rápida passagem de dois minutos em ácido acético 1%, em água destilada por cinco minutos e foi feita uma desidratação com álcool 90% e duas vezes com álcool absoluto (100%) cinco minutos em cada solução. Por último, o material foi inserido no xilol I e xilol II, cinco minutos em cada.

As lâminas foram montadas secando ao redor do material inserido nas lâminas. Foram colocadas duas gotas de Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA) sobre o material e a lamínula foi inserida, sendo solta a 30° da lâmina para evitar a formação de bolhas e, finalmente, apertou-se a lamínula sobre a lâmina para retirar as bolhas que se formaram.

O material foi processado, corado e analisado e as características morfológicas encontradas foram foto documentadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

5.3.2 Processamento da amostra para microscopia eletrônica de transmissão

Após fixação em glutaraldeído 2,5%, o material foi inserido em micro tubo de 0,5mL e lavado em PBS 1x, três vezes de 15 minutos em misturador rotatório. Em seguida, micro tubo foi envolvido por papel alumínio e o material foi deixado no misturador por duas horas em tetróxido de ósmio 1%. O envolvimento do material inserido no micro tubo em papel alumínio é de fundamental importância, já que o tetróxido de ósmio e o acetato de uranila reagem na presença de luz.

Em cada troca de substância em contato com a amostra, cada solução foi retirada do micro tubo com pipeta plástica e a nova solução foi adicionada no mesmo micro tubo, sendo assim, não houve manipulação direta e constante do material para não danificá-lo. Toda manipulação foi feita dentro da capela, por existirem substâncias tóxicas no protocolo.

Para lavagem do excesso de resíduos, o material foi deixado em PBS 1% três vezes de 10 minutos.

Para o processo de desidratação, o material foi deixado quinze minutos em cada álcool 70°, 80° e 90° respectivamente e três vezes de 10 minutos no álcool

absoluto (100°). Para finalizar a etapa de desidratação foi trocado o álcool absoluto por óxido de propileno duas vezes de 15 minutos cada.

Para início da inclusão, foi misturada resina Spurr® (Electron Microscopy Sciences®, Hatfield- Pensilvânia. Componentes: vinyl cyclohexene Dioxide- ERL 4206, epoxy resin- DER 736, nonenyl succinic anhydride modified- NSA e 2-dimethylamino ethanol- DMAE) (Quadro 1) com óxido de propileno na proporção 1:1, adicionou-se cerca de 1mL da mistura no material em micro tubo, com tampa aberta, que foi colocado em misturador rotatório por um período de quatro horas. Em seguida, a mistura foi trocada por resina pura (Quadro 1), deixada no misturador rotatório de 12 a 18 horas, em micro tubo com tampa fechada.

Foi trocada a resina do micro tubo com material por uma nova resina pura e foi deixado em estufa a 37°C por uma hora, com tampa aberta para a evaporação do resíduo de óxido de propileno que ainda estava presente na amostra.

Uma fina camada de nova resina pura foi adicionada ao molde, foi etiquetado e colocada a amostra na superfície superior dos poços, daí então, preencheu-se esses poços com resina pura até que a superfície dos poços ficassem abaloadas com a resina. Para finalização do processo de inclusão do material, a bandeja com o material e resina pura foi colocada em estufa a 60°C pelo período de cinco dias.

Em Ultramicrotomo (Leica® Ultracut UD) foram feitos cortes semi-finos de 400nm, com navalha de vidro. Esses cortes foram corados com azul de toluidina para observação de estruturas em Microscópio Óptico, então verificou-se se realmente o material foi incluído de forma correta e se as estruturas que desejou-se observar estão presentes naquele fragmento da amostra. Após verificação concluída, foram feitos cortes ultrafinos do material de 50nm. Inseriu-se o material em tela de metal de 3mm e contrastou-o com acetato de uranila 2% por 10 minutos, lavado em água destilada e, em seguida, em citrato de chumbo 0,5% por oito minutos com subsequente lavagem em água destilada.

Produto	Total (40 poços)	¼ do total #
ERL- 4206	10 gramas	2,5 gramas
DER- 736	6 gramas	1,5 gramas
NSA	26 gramas	6,5 gramas
DMAE *	0,4 gramas	0,1 gramas

receita suficiente para 10 poços do molde de silicone desde que os fragmentos do material sejam processados em micro tubos de 0,5mL.

*É o catalisador.

Quadro 1 - Receita para o preparo de resina pura utilizada para o processamento de material na microscopia eletrônica de transmissão

Após procedimento de preparo, o material foi fotografado em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Morgani® 268D).

5.3.3 Imuno- histoquímica (IHC) para distrofina

Os mesmos cortes de 5µm utilizados para as colorações HE, PAS e Tricrômio de Masson foram fixados em lâminas sinalizadas, quatro cortes, um em cada extremidade de duas lâminas. Sofreram o processo de desparafinização em estufa a 37°C por 24 horas, seguido de desidratação alcoólica e diafanização em xilol. Foi realizado um bloqueio com peroxidase a 3% em álcool etílico absoluto. Seguiu-se uma lavagem em água destilada e as lâminas foram feridas em tampão citrato por 14 minutos em microondas na potência de 80%. Em seguida, as lâminas foram deixadas em resfriamento no próprio tampão e foram lavadas em água destilada sob constante agitação. Foi adicionado Protein Block (Dako) por 45 minutos em câmara úmida para o bloqueio de proteínas inespecíficas. Retirou-se o excesso do Protein Block e adicionou-se o anticorpo primário DYS-1 (Novocastra) na diluição de 1:20 em apenas um corte (no caso, o superior) overnight, deixando o outro corte como controle negativo com PBS para o descarte de falsos- positivos. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes de cinco minutos em PBS e aplicou-se o anticorpo secundário vimentina- sptreptavidina (LSAB⁺ - Dako) nos dois cortes superiores de cada lâmina, deixando-os reagir por 45 minutos. A revelação foi realizada por kit

DAB⁺ (Dako) e a totalidade das lâminas foram coradas com hematoxilina e novamente desidratadas com álcoois e diafanizadas em xilol.

Após a verificação da negatividade da IHC com a diluição 1:20 do anticorpo, esta diluição foi concentrada em 50%, ou seja 1:10.

5.4 Animais e grupos experimentais para análise sanguínea

Em filhotes caninos, a concentração de T₄ total sérica é de duas a cinco vezes maior quando comparados a cães adultos, sendo assim, há um declínio relacionado a idade nestas concentrações e na resposta à estimulação do TSH (CUNNINGHAM, 2004). Os níveis baixos de hormônios tireóideos, ou hipotireoidismo, é comum na espécie canina. O Golden Retriever é uma das raças que apresentam predisposição e, as raças de alto risco, manifestam sintomas em idade adulta mais avançada (CUNNINGHAM, 2004). Segundo Souza et al. (2006), a espécie canina é considerada adulta a partir de um ano de idade. Sendo assim, a pesquisa foi composta somente por cães adultos, divididos em cinco grupos: dois grupos composto por cães machos e fêmeas não portadores do gene e não afetados pela distrofia, denominados sadios (grupo GR machos e GR fêmeas controles), outro por cadelas portadoras do gene da distrofia (portadoras) e outros por cães machos e fêmeas afetados pela distrofia muscular (grupo GRMD machos e GRMD fêmeas), todos os grupos serão da mesma raça, o Golden Retriever. Cada um dos grupos foi subdividido de acordo com as idades dos animais (Quadro 2), sendo:

- Grupo GRMD machos:

GRMDm I – quatro cães afetados com idade entre um e três anos (1K6, 2Bi7, 2L2 e 2L3);

GRMDm II – quatro cães afetados com idades acima de quatro anos (C5, I4, M4 e M5).

- Grupo GRMD fêmeas:

GRMDf I – cinco cadelas afetadas com idade entre um e três anos (1K1, 1K3, 3L2, 3L1 e 3H6);

GRMDf II – cadelas afetadas com idades acima de quatro anos (n= não se aplica).

- Grupo GR Portadoras

Portadora I – portadoras com idade entre um e três anos (n= não se aplica);

Portadora II – sete portadoras com idades acima de quatro anos (3R4, 3R3, I3, 2R6, 2R3, 4B6 e 3B5).

- Grupo GR machos:

GRm I – dois cães controle com idade entre um e três anos (Ru e Bn);

GRm II – três cães controle com idades acima de quatro anos (Jx, Fs e Ca).

- Grupo GR fêmeas:

GRf I – cinco cadelas controle com idade entre um e três anos, sendo que duas copularam a, aproximadamente, duas semanas (Sr, Sy, Lou, Hr e Vu, sendo que Hr e Vu copularam);

GRf II – cinco cadelas controle com idades acima de quatro anos (Na, So, Jy, At e Se).

Nos subgrupos GRMDf II e Portadora I não são aplicáveis, pois o canil GRMD Brasil situado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade não continha cães com essas características nas datas das coletas.

Grupos Idade	GR machos	GR fêmeas	GRMD machos	GRMD fêmeas	GR portadoras
De um a três anos	GRm I	GRf I	GRMDm I	GRMDf I	Portadora I
Acima de quatro anos	GRm II	GRf II	GRMDm II	GRMDf II	Portadora II

Quadro 2 - Divisão em grupos e subgrupos relacionados com sexo e idade de GRMD, Portadoras e cães controle

Os cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular (GRMD) e as portadoras, são pertencentes ao grupo de animais do canil GRMD Brasil localizado no Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, coordenado pela Profa. Dra. Maria Angélica Miglino. Os diagnósticos de distrofia muscular e de estado normal de saúde necessários para as avaliações, foram realizados pelas equipes do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo –(IB-USP) e do Canil GRMD Brasil do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP, através da genotipagem de acordo com Bartlett et al. (1996).

Os cães controle (saudáveis) foram utilizados do canil Encrenquinhas, localizado na Estrada da Sardinha, número 10, Bairro do Portão, Atibaia- SP.

Sendo assim, todos os cães foram provenientes de canis já que a diferença na manipulação desses pode alterar a quantificação hormonal.

Todos os animais envolvidos no experimento foram, semanalmente, avaliados para garantir que estes se encontrem dentro dos parâmetros de saúde preconizados bem como assegurar que não haja nenhum distúrbio que possa interferir no estudo. Estes animais foram mantidos sob condições adequadas de cuidados médicos veterinários, alimentação e higiene.

5.4.1 Coleta de amostras sanguíneas

Os glicocorticóides são secretados principalmente na zona fasciculada do córtex da adrenal, sendo que o mais importante glicocorticóide é o cortisol (Banks, 1992). O estresse aumenta, dentro de minutos, a concentração de cortisol plasmático além do limite da normalidade (CUNNINGHAM, 2004). Devido a possíveis alterações, a coleta de todos os grupos foi realizada no período da manhã, antes de haver a manipulação dos animais, na tentativa de falsos resultados serem evitados.

As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção da veia cefálica de cada animal. Aproximadamente 7mL de sangue total contido em tubos secos específicos para coletas sanguíneas, foram centrifugados a 1500 rotações por

minuto por 15 minutos. Obteve-se 1ml de soro que foi transferido para tubos plásticos resistentes ao congelamento, os micro tubo. As amostras de soro foram armazenadas em freezer a -80°C até o processamento.

Para todos os grupos o material biológico foi obtido em duplicata, com intervalo de um mês entre a primeira e a segunda coleta.

5.4.2 Exame laboratorial Radioimunoensaio

As amostras foram encaminhadas a Laboratório de Dosagens Hormonais Provet® (Medicina Veterinária Diagnóstica. Avenida Aratãs, 1009, Moema- SP), o qual realizou os ensaios através do radioimunoensaio.

As análises sanguíneas, de cães afetados pela distrofia progressiva, cadelas portadoras e cães saudáveis, foram realizadas através de radioimunoensaio, sendo que T₄ livre foi analisado pelo método de diálise bifásica. Cunningham (2004) relata que estudos demonstraram que medidas da T₄ livre por diálise mostraram-se 90% mais precisas que outras formas de mensuração.

O laboratório especializado utilizou kits humanos Coat-A-Count® da Siemens Medical Solutions Diagnostics, com devida curva de validação para a espécie canina, para a análise de cortisol, T₃ total, T₄ total e o kit GammaCoat™ Free T₄ (Two-step) da DiaSorin para a análise de T₄ livre pelo método de extração bifásica. O kit específico para a espécie canina para análise de TSH utilizado foi Coat-A-Count® Canine TSH IRMA da Siemens Medical Solutions Diagnostics .

O protocolo utilizado foi o recomendado pelo fabricante e os padrões de qualidade foram empregados de acordo com o utilizado na rotina do laboratório Provet®.

5.4.3 Estatística das análises sanguíneas

Para cada amostra de cada animal como para cada hormônio, realizou-se análise estatística

Amostragem

Foram analisados 35 animais divididos segundo o sexo (Macho ou Fêmea), idade (de um a três anos e acima de quatro anos), genótipo para a doença distrofia muscular (portadora, afetado(a) ou sadio(a)) e também se a fêmea havia copulado. Os dados analisados foram referentes aos níveis encontrados no sangue de: Cortisol ($\mu\text{g/dL}$), T_3 total (ng/mL), T_4 total ($\mu\text{g/dL}$), T_4 livre (ng/mL) e TSH (ng/mL).

Análise dos dados

Primeiramente foram executados testes “t” bicaudal de Student com os valores médios das duas coletas sanguíneas dos animais para comparar entre os sexos, entre as idades e, para cada sexo, entre as idades.

Foram executados testes de análise de variância (ANOVA) para os genótipos entre os valores médios das duas coletas sanguíneas dos animais. Primeiramente realizamos a análise considerando somente o genótipo, depois o genótipo e o sexo, o genótipo e a idade, e, por último, o genótipo, a idade e o sexo.

Foi realizado, também, um teste *pos hoc*. O teste escolhido foi o teste HSD de Tukey (Honestly Significant Difference), para determinar as diferenças significantes entre as médias de todos os grupos analisados no teste ANOVA, tomadas duas a duas.

Todas as análises foram realizadas linguagem R versão 2.10 (R Development Core Team 2010).

R Development Core Team (2009). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena. URL: <http://www.R-project.org>.

6 RESULTADOS

Resultados macro e microscópicos das glândulas adrenais e tireóide de cães afetados pela distrofia muscular e cão controle e análises hormonais de cães afetados, cães controles e cadelas portadoras.

6.1 A glândula adrenal

A glândula adrenal e seus achados macro e microscópicos.

6.1.1 Resultados macroscópicos

Após incisão longitudinal na linha alba foi acessada a cavidade abdominal e com isso a glândula adrenal pode ser observada. Macroscopicamente observaram-se as glândulas adrenais topograficamente dispostas bilateralmente próximas a borda craniomedial renal (Figura 2A) e caudalmente ao fígado (Figuras 2B e 2C). Essas glândulas apresentavam coloração esbranquiçada, aspecto rígido (Figura 3) e encontravam-se envoltas por uma cápsula de tecido conectivo de espessura fina e de aspecto translúcido (Figuras 2B e 2C).

Durante as análises realizadas foi possível verificar que o tamanho e o peso das glândulas adrenais variaram, de forma crescente, de acordo com a idade dos animais, onde se visualizou que a variação tamanho e peso era diretamente proporcionais a idade quando jovens era menor e quando adulto maior que estão representados no quadro 3. Ao observar possíveis diferenças macroscópicas entre as glândulas adrenais direita e esquerda foi notada uma região de “estrangulamento” que provavelmente seja o local de passagem de vasos sanguíneos (Figura 3). Não foram notadas outras diferenças marcantes entre estas.

Figura 2 - Fotomacrografia de estruturas abdominais “*in situ*” de cão macho GRMD M5. Em (A) evidenciamos, ao centro da imagem, a lateral do rim esquerdo (RE), com seus pólos cranial (Pcr) e caudal (Pcd) e, em sua porção convexa, o hílio (hi). Em contato com seu pólo caudal (Pcd) visualizamos a bexiga (Be). Em sua porção cranial encontra-se a glândula adrenal esquerda (Ad). Na imagem (B) acima do pólo cranial (Pcr) do rim esquerdo (RE) localiza-se o fígado e, internamente, a adrenal esquerda (círculo). Em (C) há o aumento da imagem (B) onde observa-se a adrenal esquerda (círculo), sobre o rim esquerdo (RE)

Figura 3 - Fotomacrografia das glândulas adrenais de cão macho GRMD M5. Em (A) evidenciamos a glândula adrenal direita e em (B) a glândula adrenal esquerda com leve estrangulamento (**seta**)

Animais características	3H2	3H4	3H9	4B4	2K11	M5	1S
Sexo/ xp ²¹	Fêmea/ portadora	Macho/ afetado	Macho/ normal	Macho/ afetado	Macho/ afetado	Macho/ afetado	Macho/ normal
Idade	2 meses	2 meses	2 meses	6 meses	9 meses	6 anos	5 anos
Tamanho (cm) direita/ esquerda	1,9/ 1,8	1,8/ 1,7	1,8/ 1,7	2,4/ 2,4	2,9/ 2,8	3,2/ 3,1	3,2/ 3,2
Peso (g) direita/ esquerda	0,789/ 0,790	0,785/ 0,792	0,785/ 0,790	0,891/ 0,899	0,903/ 0,909	1,002/ 1,008	1,003/ 1,007

Quadro 3 - Características relacionadas a cada animal e suas respectivas glândulas adrenais

6.1.2 Resultados microscópicos

A análise microscópica das glândulas foi realizada através dos processamentos histológicos nas colorações Hematoxilina-Eosina (HE), ácido

periódico- Schiff (PAS) e Tricromio de Masson para microscopia de luz, assim como em análise de microscopia eletrônica de transmissão.

6.1.2.1 A glândula adrenal por microscopia de luz

Os resultados microscópicos da glândula adrenal revelam que, independente de serem animais afetados ou sadios, apresentam-se cobertas por tecido conjuntivo irregular denso (Figura 6A). Cada glândula apresenta uma cápsula (Figuras 4A, 4B, 4C, 6A, 6B, 6C e 6D) e se organiza em córtex periférico e medula central (Figuras 4A e 4B).

O córtex da adrenal apresenta-se dividido em três zonas: zona glomerulosa, fasciculada e zona reticulada (Figuras 4A e 4B). A zona glomerulosa é a mais externa e apresenta células parenquimatosas glomerulares (Figuras 4C, 4D, 4F, 6A, 6B e 6C), enquanto que na zona fasciculada encontramos células parenquimatosas com citoplasma alongado circundadas por sinusóides (Figuras 4E, 4I, 4H, 6E e 6F) e na zona reticulada, as células parenquimatosas reticulares encontram-se em formato mais arredondado (Figuras 4H, 4J, 6E e 6F).

Na zona medular, as células são desorganizadas, apresentam alta vascularização, com vasos de calibres mais grossos (Figuras 6E, 6G e 6H) e há a presença também de alto número de sinusóides medulares (Figura 4J).

Nas adrenais pesquisadas de cães GRMD e cães sadios foram encontradas fibras de colágeno, identificadas pela coloração Tricrômio de Masson, em todas as estruturas (Figura 6).

A zona fasciculada dos animais GRMD (Figuras 4B e 6F) estudados apresentou-se com maior densidade celular, havendo um menor número de sinusóides do que o animal sadio (Figuras 4A e 6A).

A reação positiva para PAS é caracterizada pela coloração que varia de vermelho a rosa. As adrenais de todos os animais estudados apresentaram esta reação positiva (Figura 5).

Figura 4 - Fotomicrografia de adrenais de cão sadio e cães afetados pela distrofia muscular por HE. As imagens (A), (F), (I) e (J) pertencem as glândulas do cão controle (1S) e as (B), (D), (E) e (G) aos afetados M5, (C) ao 2K11 e (H) ao 4B4. Em (A) e (B) visualizamos a cápsula (Cp), as zonas glomerulosa (ZG), fasciculada (ZF), reticulada (ZR) e medular (M). Em (C) observamos a cápsula (Cp) e demonstramos a zona glomerulosa (círculo) aumentada na imagem (D), onde evidenciam-se as células parenquimais da zona glomerulosa (círculo tracejado). Em (F) encontram-se as mesmas estruturas indicadas em (C) e (D). As imagens (E) e (I) correspondem a zona fasciculada onde estão presentes as células parenquimais (Pf) desta zona e ainda em (E) encontramos um somito (s). Na figura (H) encontramos as células parenquimais da zona fasciculada (Pf), vasos sanguíneos (setas) e células parenquimais da zona reticulada (Pr), células também encontradas em (G). Na zona medular em (J) encontramos somitos (sm) e células parenquimais (Pm)

Figura 5 - Fotomicrografias de adrenais de GRMD (M5, 2K11 e 4B4) e cão controle (1S) por PAS. Em (A), (B), (C) e (D) observamos as zonas glomerulosa e fasciculada. Em (E), (F), (G) e (H) visualizamos as zonas fasciculada e reticulada. Em (I), (J), (K) e (L) encontramos as zonas reticulada e medular

Figura 6 - Fotomicrografia de adrenais de cão sadio e cães afetados pela distrofia muscular por Tricrômio de Masson. As imagens (A), (E) e (G) pertencem ao cão sadio (1S) enquanto que as imagens (C), (D), (F) e (H) pertencem a GRMD. As setas verdes indicam fibras de colágeno em todas as imagens. Em (A) observamos vascularização por artéria (a) e veia (v) presentes no tecido conjuntivo (Tc), a zona fasciculada (ZF), a cápsula, assim como em (B). Em (B) visualizamos o aumento do círculo em (C) indicando as células parenquimais da zona glomerulosa (setas). Em (C) encontramos a cápsula (Cp) e a zona glomerulosa (ZG). (D) é a imagem da cápsula (Cp) ampliada. Em (E) temos a zona fasciculada (ZF) com seus somitos (s), a zona reticulada (ZR) e a zona medular (ZM). Avistamos a zona fasciculada e reticulada também em (F). Estão presentes, em (G) e (H), vasos sanguíneos (vs) na zona medular (ZM)

6.1.2.2 A glândula adrenal por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Através da microscopia eletrônica de transmissão são possíveis de serem observadas as ultra-estruturas celulares.

A zona glomerulosa, presente no córtex da adrenal, apresenta-se disposta de células parenquimatosas com o núcleo bem definido, ademais as estruturas celulares visualizadas (como os lisossomos e as mitocôndrias) são semelhantes no animal sadio (Figura 7A) e nos GRMD (Figura 7B).

As células parenquimais da zona fasciculada dos animais afetados também apresentaram-se intactas estruturalmente (Figura 8C), organizadas de forma linear (Figura 8B) o que também foi observado nos animais sadios (Figura 8A). Os sinusóides são encontrados nos animais sadios (Figura 8A) em comparação aos GRMD (Figura 8B). As outras estruturas comuns e intactas encontradas foram: o citoplasma e o núcleo celular. As células da zona fasciculada dos cães afetados apresentaram estruturas típicas da maioria das células do organismo: o núcleo, o retículo endoplasmático rugoso, o Complexo de Golgi, as mitocôndrias, os lisossomos e a membrana plasmática (GARTNER; HIATT, 2002).

Figura 7 - Ultra- estruturas da zona glomerulosa das adrenais caninas GRMD e controle em MET. Em (A) observamos, na zona glomerulosa do cão sadio 1S, o núcleo das células parenquimatosas (CP), lisossomos (Li), mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático granuloso (REG). Em (B) observa-se a zona glomerulosa de cão GRMD onde encontramos o núcleo das células parenquimatosas (CP), lisossomos (Li), mitocôndrias (M) e o complexo de Golgi (G)

Figura 8 - Ultra- estruturas da zona fasciculada das adrenais caninas GRMD e controle em MET. Em (C) temos as células parenquimatosas da zona fasciculada do cão controle indicando sinusóides (**s**), citoplasma (**cit**) e núcleo celular (**N**). A imagem (D) apresenta as mesmas estruturas de (C), com exceção dos sinusóides. Em (E) visualizamos uma célula parenquimatosa da zona fasciculada de cão GRMD com núcleo (**N**), retículo endoplasmático rugoso (**RER**), Golgi (**G**), mitocôndria (**M**), lisossomos (**L**) e a membrana plasmática (**MP**)

6.1.3 Análise hormonal: Cortisol

Foram feitas duas coletas do material biológico sanguíneo de cada animal estudado. Os valores para os níveis de cortisol de cada animal (Figura 9), assim como a média das duas coletas e o desvio padrão encontram-se na tabela 1.

Os animais apresentaram média dos valores coletados igual a $1.7348 \mu\text{g/dL}$ (± 0.7071).

As análises de variância (ANOVA) realizadas para os valores de cortisol indicaram que houve diferença entre os genótipos ($F_{2,32}=3.898$, $p=0.0305$, Figura 10). O teste Tukey HSD apontou diferença significativa para os valores de cortisol para os genótipos “portadoras” e “afetados” (0.837 ± 0.753 , $p=0.0267$), sendo que os “afetados” (1.3865 ± 0.5164) apresentaram significativamente menos cortisol do que as “portadoras” (2.223 ± 0.5884). Não houve diferença significativa entre genótipo, sexo e classes de idade (Figura 11).

Tabela 1 - Valores dos níveis de cortisol de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal

Genótipo e classes de Idade	Animal	Cortisol (µg/dL) 1ª coleta	Cortisol (µg/dL) 2ª coleta	Média (µg/dL)	Desvio Padrão	Comparação com valores de referência
Fêmeas sadias de um a três anos	Sr	1,32	1,71	1,515	0,275771645	↓
	Sy	2,03	*	2,03		Ok
	Lou	2,01	2,14	2,075	0,091923882	Ok
	Hr	1,14	1,32	1,23	0,127279221	↓
	Vu	5,06	1,48	3,27	2,531442277	Ok
Fêmeas sadias acima de quatro anos	An	1,27	0,8	1,035	0,332340187	↓
	So	2,28	1,34	1,81	0,664680374	Ok
	Jy	1,02	*	1,02		↓
	At	3,02	2,32	2,67	0,494974747	Ok
	Se	1,9	1,47	1,685	0,304055916	↓
Fêmeas portadoras acima de quatro anos	3R4	1,61	2,19	1,9	0,410121933	Ok
	3R3	2,78	1,25	2,015	1,081873375	Ok
	I3	2,09	2,66	2,375	0,403050865	Ok
	2R6	1,65	2,4	2,025	0,530330086	Ok
	2R3	2,01	3,26	2,635	0,883883476	Ok
	4B6	1,79	4,66	3,225	2,029396462	Ok
	3B5	1,42	1,36	1,39	0,042426407	↓
Fêmeas afetadas de um a três anos	1K1	1,58	1,48	1,53	0,070710678	↓
	1K3	1,11	1,01	1,06	0,070710678	↓
	3L2	1,09	1,47	1,28	0,268700577	↓
	3L1	0,98	1,8	1,39	0,579827561	↓
	3H6	1,09	2,38	1,735	0,912167748	↓
Machos sadios de um a três anos	Ru	4,25	1,69	2,97	1,81019336	Ok
	Bn	1,14	0,88	1,01	0,183847763	↓
Machos sadios acima de quatro anos	Jx	0,91	1,75	1,33	0,593969696	↓
	Fs	1,11	4,11	2,61	2,121320344	Ok
	Ca	0,94	0,8	0,87	0,098994949	↓
Machos afetados de um a três anos	1K6	0,99	1,03	1,01	0,028284271	↓
	2Bi7	1,34	2,06	1,7	0,509116882	↓
	2L2	0,91	1,32	1,115	0,28991378	↓
	2L3	0,66	0,92	0,79	0,183847763	↓
Machos afetados acima de quatro anos	C5	1,96	1,75	1,855	0,148492424	Ok
	I4	0,61	1,45	1,03	0,593969696	↓
	M4	0,68	1,04	0,86	0,254558441	↓
	M5	2,97	2,37	2,67	0,424264069	Ok

*Amostra inviável; ↓ valores da média abaixo dos valores de referência do cortisol; ↑ valores da média acima dos valores de referência; Ok valores da média correspondentes aos valores de referência. Valores de referência para o cortisol: 1,8 a 4,0µg/dL.

Figura 9 - Média dos níveis de cortisol por animal estudado e valores de referência. Demonstra-se o grupo GRf I (**amarelo**), GRf II (**verde claro**), Portadora II (**vermelho**), GRMDf I (**roxo**), GRm I (**verde escuro**), GRm II (**azul**), GRMDm I (**marrom**), GRMDm II (**laranja**), valores de referência (**preto**) mínimo (**Ref. Mín**) e máximo (**Ref. Máx**)

Figura 10 - Gráfico estatístico do nível de cortisol para os diferentes genótipos. Cães afetados (**Afetado**), cadelas portadoras (**Portadora**) e cães controle (**Sadio**), independente de idade e sexo

Figura 11 - Gráfico estatístico do nível de cortisol para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade. Fêmea afetada de um a três anos de idade (**Fêmea afetada A**), fêmea portadora acima de quatro anos (**Portadora B**), fêmea controle de um a três anos (**Fêmea sadia A**), fêmea controle acima de quatro anos (**fêmea sadia B**), macho GRMD de um a três anos (**Macho afetado A**), macho GRMD acima de quatro anos (**Macho afetado B**), macho controle de um a três anos (**Macho sadio A**) e macho controle acima de quatro anos de idade (**Macho sadio B**)

6.2 A glândula tireóide

Os resultados a seguir, são referentes a glândula tireóide, nos aspectos macroscópicos e microscópicos.

6.2.1 Resultados macroscópicos

Após a incisão e dissecação da musculatura do pescoço dos animais GRMD, foi possível observar a traquéia e as glândulas tireóides. Estas glândulas estavam localizadas na região entre o primeiro e o sexto anéis traqueais, caudalmente a cartilagem tireóide e cartilagem cricóide (Figura 12A e 12B). Sobre o pólo cranial da tireóide, situa-se a paratireóide (Figura 12A).

Macroscopicamente a tireóide apresentou-se com coloração castanha e com aspecto parcialmente translúcido e gelatinoso. Os lobos tireoideanos têm formato alongado (Figuras 13A e 13B). O tamanho e peso das glândulas tireóides caninas variam, de forma crescente, de acordo com a idade dos animais (Quadro 4).

Figura 12 - Fotomacrografia “*in situ*” das estruturas da região do pescoço de cão macho GRMD (3H4) e fêmea portadora (3H2) com dois meses de idade. Em (A) evidenciamos cranialmente a cartilagem tireóide (CT) e a cartilagem cricóide (CC) seguidas, caudalmente, pela traquéia. As glândulas tireóideas direita (TD) e esquerda (TE) localizam-se lateralmente entre o primeiro e sexto anéis traqueais (1º; 6º) e a paratireóide (**círculo**) encontra-se no pólo cranial da tireóide do animal afetado 3H4. Em (B) melhor evidenciamos a tireóide direita (TD) separadamente à traquéia (tr) assim como das cartilagens tireóide (CT) e cricóide (CC) interligadas pelo ligamento cricotireoideo (LCT) da cadela portadora 3H2

Figura 13 - Fotografia das tireóides do cão afetado M5. As figuras (A) e (B) correspondem à glândula tireóide (T) direita e esquerda, respectivamente. Em (A) observamos a paratireóide (PT) situada, lateralmente, no pólo cranial da tireóide

Animais características	3H2	3H4	3H9	SIMBA	REAL	PETER	1S
Sexo/ xp ²¹	Femea/ portadora	Macho/ afetado	Macho/ normal	Macho/ afetado	Macho/ afetado	Macho/ afetado	Macho/ normal
Idade	2 meses	2 meses	2 meses	6 meses	9 meses	6 anos	5 anos
Tamanho* (cm) direita/ esquerda	2,3 2,3	2,3 2,2	2,2 2,3	2,5 2,6	2,7 2,6	3,1 3,1	2,9 3,0
Peso (g) direita/ esquerda	1,215 1,221	1,219 1,210	1,211 1,218	1, 229 1,231	1,244 1,135	1,273 1,270	1,270 1,268

*tamanho craniocaudal.

Quadro 4 - Características relacionadas a cada animal e suas respectivas glândulas tireóide

6.2.2 Resultados microscópicos

A análise microscópica das glândulas foi realizada através do processamentos histológicos nas colorações Hematoxilina-Eosina (HE), ácido periódico-Schiff (PAS) e Tricromio de Masson para microscopia de luz, assim como em análise de microscopia eletrônica de transmissão.

6.2.2.1 A glândula tireóide por microscopia de luz

Com as técnicas em microscopia de luz observamos que em toda extensão da glândula existem basicamente as mesmas estruturas: uma fina cápsula, uma vasta vascularização da tireóide (Figuras 14D, 14F, 19E e 19F) nos animais sadios e nos cães GRMD, assim como o formato arredondado ou oval dos folículos tireóideos (Figuras 14A e 14D) bem definido através das células foliculares (Figuras 14A, 14B, 14C, 14D, 14F, 16A, 16B, 16C, 16D e

16F); células que diferenciam-se das parafoliculares (Figuras 14A, 14C, 14E, 14F, 16A, 16C, 16D e 16F).

Em ambos os grupos de animais (controle e GRMD), através da aplicação da coloração de Tricrômio de Masson identificamos fibras de colágeno por todos os cortes histológicos analisados (Figura 14).

Todas as estruturas identificadas na glândula tireóide do cão sadio foram encontradas também nos cães GRMD, todavia as células foliculares do controle apresentam formato arredondado (Figuras 14E, 14F e 16F), enquanto que essas mesmas células de dois cães afetados (2K11 e 4B4) são alongadas e ovaladas (Figuras 14B, 14C, 19A, 16B e 16C) possíveis de serem identificadas através destas técnicas.

A reação positiva para PAS é caracterizada pela coloração que varia de vermelho a rosa. As tireóides de todos os animais estudados apresentaram esta reação positiva (Figura 15).

Figura 14 - Fotomicrografia das estruturas da glândula tireóide em cortes transversais e em coloração Hematoxilina- Eosina. Em (A) evidenciamos os folículos de tamanhos variados (**círculos**), contornados pelas células foliculares (**seta tracejada**) e preenchidos pelo colóide (**Co**); em localização aleatória, ao lado externo dos folículos, encontramos as células parafoliculares (**setas cheias**) do cão afetado 2K11. Nas imagens (B) e (C) novamente observamos no interior dos folículos o colóide (**Co**), as células foliculares os circundando (**setas tracejadas**) e as células parafoliculares (**setas cheias**) dos cães afetados 2K11 e 4B4, respectivamente. A figura (D) corresponde a tireóide do M5 onde demonstra a vascularização da glândula com as veias (**v**) e artérias (**a**) envolvidas por músculo liso (**ml**) entre os folículos (**círculo**), com o colóide (**Co**) e as células foliculares (**seta tracejada**). As imagens (E) e (F) pertencem ao controle 1S e em ambas observamos o colóide (**Co**), as células foliculares (**setas tracejadas**) e as células parafoliculares (**setas cheias**). Ainda em (F) visualizamos os vasos sanguíneos (**vs**) repletos células sanguíneas

Figura 15 - Fotomicrografias das tireóides de GRMD e cão controle por PAS. Em (A) observamos a tireóide do cão controle 1S, (B) do GRMD M5, (C) do 2K11 e (D) do afetado 4B4

Figura 16 - Fotomicrografia das estruturas da glândula tireóide em cortes transversais e por coloração Tricrômio de Masson. A figura (A) e (B) corresponde ao cão afetado 2K11, (C) e (D) ao animal afetado 4B4 e as imagens (E) e (F) pertencem ao controle 1S. Em todas as figuras destacamos os folículos preenchidos pelo colóide (**Co**), envolvidos pelas células foliculares (**setas tracejadas**) e por toda as imagens há a presença das células parafoliculares (**setas cheias**), com exceção da imagem (E) que por estar em objetiva de baixa visualização, indicamos somente o colóide (**Co**). Identificamos o citoplasma (**seta amarela**) e o núcleo (**seta azul**) das células parafoliculares (**setas cheias**) nas figuras (C) e (D). Os vasos (**vs**) repletos de células sanguíneas (**sg**) são observados em (A) e (F). Em todas as figuras desta prancha estão presentes fibras de colágeno em azul (**setas verdes**)

6.2.2.2 A glândula tireóide por microscopia eletrônica de transmissão

Nas tireóides dos cães afetados observamos as estruturas características da glândula como o colóide (Figuras 17C e 17E) e as células foliculares (Figuras 17C, 17D, 17E e 17F) formando os folículos e as células parafoliculares (Figuras 17C, 17D, 17E e 17F), estruturas estas encontradas também nos cães saudáveis (Figuras 17A e 17B). Algumas das estruturas comuns em muitas células como o retículo endoplasmático granuloso, Golgi, os lisossomos, as mitocôndrias (GARTNER; HIATT, 2002) também foram identificadas nos GRMD (Figuras 17D e 17F).

A característica encontrada nas células foliculares, o formato cubóide, dos cães controles (Figura 18A) não foi a mesma em dois animais afetados (2K11 e 4B4), as quais apresentaram essas células com aspecto alongado (Figuras 18D e 18E). No GRMD M5, algumas destas células apresentaram aspecto cubóide e outras aspecto ovalado (Figuras 18B e 18C).

Figura 17 - Ultra- estruturas de tireóides caninas GRMD e controle por MET. Em (A) observamos o colóide (**Co**) e as células foliculares (**CF**) com os lisossomos (**L**) e as células parafoliculares (**CPF**) com núcleo (**N**) e grânulos de calcitonina (**g**) do cão sadio 1S. Também no cão controle, a imagem (B) indica o núcleo da célula folicular (**NCF**), o lúmen (**Lu**), retículo endoplasmático granuloso (**REG**), mitocôndrias (**M**), lisossomos (**Li**), gotículas de colóide (**CD**), células parafoliculares (**CPF**) com núcleos (**N**) e grânulos de calcitonina (**g**). Em (C) encontramos colóide (**Co**), células foliculares (**CF**), células parafolículos (**CPF**) com núcleo (**N**) e grânulos de calcitonina do cão afetado 4B4. Do cão afetado 2K11, na imagem (D) indicamos célula folicular (**CF**) com retículo endoplasmático granuloso (**REG**), Golgi (**G**), lisossomos (**L**), mitocôndrias (**M**) e a célula parafolicular (**CPF**) com grânulo de calcitonina (**g**). As imagens (E) e (F) pertencem ao GRMD M5. Em (E) observamos células parafoliculares (**CPF**) com núcleos (**N**) e grânulos de calcitonina (**g**), lisossomos (**Li**), gotículas de colóide (**CD**), colóide (**Co**) e células foliculares (**CF**). Na figura (F) encontramos mitocôndrias (**M**), lisossomos (**Li**), gotículas de colóide (**CD**), células parafoliculares (**CPF**) com núcleo (**N**), retículo endoplasmático granuloso (**REG**), Golgi (**G**) e célula folicular (**CF**)

Figura 18 - As células foliculares das tireóides dos GRMD e do cão controle por MET. Em (A) observamos colóide (Co), lisossomos (L) e células foliculares cubóides (**seta azul**) do cão controle 1S. Em (B) visualizamos células foliculares cubóides (**seta azul**) e células foliculares alongadas (**seta vermelha**) e em (C) comente células foliculares cubóides (**seta azul**), ambas as imagens do cão GRMD M5. Nas imagens (D) e (E) do 2K11 e 4B4 respectivamente, encontramos células parafoliculares (CPF), colóide (Co) e células foliculares (CF) alongadas (**setas vermelhas**)

6.2.3 Análise hormonal: T₃, T₄ Total, T₄ Livre e TSH

Foram analisados os hormônios considerados importantes para a avaliação da função da tireóide

6.2.3.1 T₃ total

Foram feitas duas coletas do material biológico sanguíneo de cada animal estudado. Os valores para os níveis de T₃ total de cada animal (Figura 19), assim como a média das duas coletas e o desvio padrão encontram-se na tabela 2.

As análises de variância (ANOVA) realizadas para os valores de T₃ total indicaram que não houve diferenças significativas entre os genótipos ($F_{2,32}=1.008$, $p=0.3788$, Figura 20) e entre os genótipos, sexo e classes de idade ($F_{7,27}=1.2657$, $p=0.3038$, Figura 21).

Tabela 2 - Valores dos níveis de T₃ total de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal

Genótipo e classes de Idade	Animal	T ₃ total (ng/mL) 1 ^a coleta	T ₃ total (ng/mL) 2 ^a coleta	Média (ng/mL)	Desvio Padrão	Comparação com valores de referência
Fêmeas sadias de um a três anos	Sr	0,76	0,65	0,705	0,077781746	Ok
	Sy	0,51	*	0,51		↓
	Lou	0,68	0,69	0,685	0,007071068	Ok
	Hr	0,58	0,63	0,605	0,035355339	Ok
	Vu	0,55	0,85	0,7	0,212132034	Ok
Fêmeas sadias acima de quatro anos	An	0,65	0,66	0,655	0,007071068	Ok
	So	0,83	0,61	0,72	0,155563492	Ok
	Jy	0,57	*	0,57		↓
	At	0,61	0,81	0,71	0,141421356	Ok
	Se	0,47	0,38	0,425	0,06363961	↓
Fêmeas portadoras acima de quatro anos	3R4	0,53	0,64	0,585	0,077781746	↓
	3R3	0,41	0,57	0,49	0,113137085	↓
	I3	0,42	0,58	0,5	0,113137085	↓
	2R6	0,58	0,85	0,715	0,190918831	Ok
	2R3	0,98	0,91	0,945	0,049497475	Ok
	4B6	0,54	0,93	0,735	0,275771645	Ok
	3B5	0,8	0,76	0,78	0,028284271	Ok
Fêmeas afetadas de um a três anos	1K1	0,85	1,22	1,035	0,261629509	Ok
	1K3	0,67	0,98	0,825	0,219203102	Ok
	3L2	0,4	0,57	0,485	0,120208153	↓
	3L1	0,62	0,65	0,635	0,021213203	Ok
	3H6	0,49	0,57	0,53	0,056568542	↓
Machos sadios de um a três anos	Ru	0,76	0,61	0,685	0,106066017	Ok
	Bn	0,65	0,71	0,68	0,042426407	Ok
Machos sadios acima de quatro anos	Jx	0,53	0,93	0,73	0,282842712	Ok
	Fs	0,85	0,58	0,715	0,190918831	Ok
	Ca	0,41	0,56	0,485	0,106066017	↓
Machos afetados de um a três anos	1K6	0,6	0,59	0,595	0,007071068	↓
	2Bi7	0,48	0,66	0,57	0,127279221	↓
	2L2	0,48	0,55	0,515	0,049497475	↓
	2L3	0,46	0,68	0,57	0,155563492	↓
Machos afetados acima de quatro anos	C5	0,38	0,63	0,505	0,176776695	↓
	I4	0,51	0,48	0,495	0,021213203	↓
	M4	0,41	0,48	0,445	0,049497475	↓
	M5	0,36	0,55	0,455	0,134350288	↓

*Amostra inviável; ↓ valores da média abaixo dos valores de referência do T₃ total; ↑ valores da média acima dos valores de referência; Ok valores da média correspondentes aos valores de referência. Valores de referência para o T₃ total: 0,6 a 1,4ng/mL.

Figura 19 - Média dos níveis de T₃ total por animal estudado e valores de referência. Demonstra-se o grupo GRf I (**amarelo**), GRf II (**verde claro**), Portadora II (**vermelho**), GRMDf I (**roxo**), GRm I (**verde escuro**), GRm II (**azul**), GRMDm I (**marrom**), GRMDm II (**laranja**), valores de referência (**preto**) mínimo (**Ref. Mín**) e máximo (**Ref. Máx**)

Figura 20 - Gráfico estatístico do nível de T₃ total para os diferentes genótipos. Cães afetados (**Afetado**), cadelas portadoras (**Portadora**) e cães controle (**Sadio**), independente de idade e sexo

Figura 21 - Gráfico estatístico do nível de T₃ total para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade. Fêmea afetada de um a três anos de idade (**Fêmea afetada A**), fêmea portadora acima de quatro anos (**Portadora B**), fêmea controle de um a três anos (**Fêmea sadia A**), fêmea controle acima de quatro anos (**fêmea sadia B**), macho GRMD de um a três anos (**Macho afetado A**), macho GRMD acima de quatro anos (**Macho afetado B**), macho controle de um a três anos (**Macho sadio A**) e macho controle acima de quatro anos de idade (**Macho sadio B**)

6.2.3.2 T_4 total

Foram feitas duas coletas do material biológico sanguíneo de cada animal estudado. Os valores para os níveis de T_4 total de cada animal (Figura 22), assim como a média das duas coletas e o desvio padrão encontram-se na tabela 3.

Média de T_4 total igual a $2.0379 \mu\text{g/dL}$ (± 0.4929). As análises de variância (ANOVA) realizadas para os valores de T_4 total indicaram que houve diferenças significativas entre os genótipos ($F_{2,32}=3.9558$, $p=0.0291$, Figura 23).

O teste Tukey HSD apontou diferença significativa entre os genótipos “sadios” e “afetados” (0.4818 ± 0.4236 , $p=0.023$). Os “sadios” apresentaram menos T_4 total (1.802 ± 0.5846) do que os “afetados” (2.2838 ± 0.3222). Entre os genótipos, considerando o sexo e a idade, os machos mais velhos (classe B) sadios diferenciaram significativamente (0.9565 ± 1.1753 , $p=0.014$) das fêmeas afetadas mais novas (classe A), sendo que os primeiros apresentaram menores valores de T_4 (1.6033 ± 0.9016) do que as segundas (1.399 ± 0.2546) (Figura 24).

Tabela 3 - Valores dos níveis de T₄ total de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal

Genótipo e classes de Idade	Animal	T ₄ total (µg/dL) 1 ^a coleta	T ₄ total (µg/dL) 2 ^a coleta	Média (µg/dL)	Desvio Padrão	Comparação com valores de referência
Fêmeas sadias de um a três anos	Sr	3,16	2,52	2,84	0,45254834	Ok
	Sy	1,88	*	1,88		Ok
	Lou	1,95	1,88	1,915	0,049497475	Ok
	Hr	2,27	2,02	2,145	0,176776695	Ok
	Vu	1,58	1,43	1,505	0,106066017	Ok
Fêmeas sadias acima de quatro anos	An	2,33	1,68	2,005	0,459619408	Ok
	So	3,11	2,26	2,685	0,601040764	Ok
	Jy	1,01	*	1,01		↓
	At	2,72	2,65	2,685	0,049497475	Ok
	Se	1,29	1,32	1,305	0,021213203	↓
Fêmeas portadoras acima de quatro anos	3R4	2,05	2,13	2,09	0,056568542	Ok
	3R3	2,33	1,72	2,025	0,431335137	Ok
	I3	2,18	1,9	2,04	0,197989899	Ok
	2R6	2,34	1,95	2,145	0,275771645	Ok
	2R3	3,14	2,31	2,725	0,586898628	Ok
	4B6	1,91	1,65	1,78	0,183847763	Ok
	3B5	2,01	1,59	1,8	0,296984848	Ok
Fêmeas afetadas de um a três anos	1K1	2,96	2,94	2,95	0,014142136	Ok
	1K3	3,02	2,85	2,935	0,120208153	Ok
	3L2	1,97	2,49	2,23	0,367695526	Ok
	3L1	2,39	2,23	2,31	0,113137085	Ok
	3H6	2,28	1,96	2,12	0,22627417	Ok
Machos sadios de um a três anos	Ru	1,27	1,88	1,575	0,431335137	Ok
	Bn	1,47	1,59	1,53	0,084852814	Ok
Machos sadios acima de quatro anos	Jx	1,49	1,51	1,5	0,014142136	Ok
	Fs	1,78	1,17	1,475	0,431335137	↓
	Ca	0,91	1,04	0,975	0,091923882	↓
Machos afetados de um a três anos	1K6	2,03	1,78	1,905	0,176776695	Ok
	2Bi7	2,18	2,36	2,27	0,127279221	Ok
	2L2	2,38	2,09	2,235	0,205060967	Ok
	2L3	2,12	2,46	2,29	0,240416306	Ok
Machos afetados acima de quatro anos	C5	2,1	2,15	2,125	0,035355339	Ok
	I4	2,62	1,72	2,17	0,636396103	Ok
	M4	2,15	2,39	2,27	0,169705627	Ok
	M5	2,11	1,65	1,88	0,325269119	Ok

*Amostra inviável; ↓ valores da média abaixo dos valores de referência do T₄ total; ↑ valores da média acima dos valores de referência; Ok valores da média correspondentes aos valores de referência. Valores de referência para o T₄ total: 1,5 a 3,8µg/dL.

Média dos níveis de T4 total por cão

Figura 22 - Média dos níveis de T₄ total por animal estudado e valores de referência. Demonstra-se o grupo GRf I (**amarelo**), GRf II (**verde claro**), Portadora II (**vermelho**), GRMDf I (**roxo**), GRm I (**verde escuro**), GRm II (**azul**), GRMDm I (**marrom**), GRMDm II (**laranja**), valores de referência (**preto**) mínimo (**Ref. Mín**) e máximo (**Ref. Máx**)

Figura 23 - Gráfico estatístico do nível de T₄ total para os diferentes genótipos. Cães afetados (**Afetado**), cadelas portadoras (**Portadora**) e cães controle (**Sadio**), independente de idade e sexo

Nível de T4 total ($\mu\text{g/dL}$) por genótipo, sexo e classe de idade

Figura 24 - Gráfico estatístico do nível de T_4 total para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade. Fêmea afetada de um a três anos de idade (**Fêmea afetada A**), fêmea portadora acima de quatro anos (**Portadora B**), fêmea controle de um a três anos (**Fêmea sadia A**), fêmea controle acima de quatro anos (**fêmea sadia B**), macho GRMD de um a três anos (**Macho afetado A**), macho GRMD acima de quatro anos (**Macho afetado B**), macho controle de um a três anos (**Macho sadio A**) e macho controle acima de quatro anos de idade (**Macho sadio B**)

6.2.3.3 T_4 livre

Foram feitas duas coletas do material biológico sanguíneo de cada animal estudado. Os valores para os níveis de T_4 livre de cada animal (Figura 25), assim como a média das duas coletas e o desvio padrão encontram-se na tabela 4.

Média igual a 0.9916 ng/dL (± 0.3097). As análises de variância (ANOVA) realizadas para os valores de T_4 livre indicaram que não houve diferenças significativas entre os genótipos ($F_{2,32}=0.3829$, $p=0.685$, Figura 26) e entre os genótipos, sexo e classes de idade ($F_{7,27}=1.4735$, $p=0.2186$, Figura 27).

Tabela 4 - Valores dos níveis de T₄ livre de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal

Genótipo e classes de Idade	Animal	T ₄ livre (ng/dL) 1 ^a coleta	T ₄ livre (ng/dL) 2 ^a coleta	Média (ng/dL)	Desvio Padrão	Comparação com valores de referência
Fêmeas sadias de um a três anos	Sr	1,44	1,5	1,47	0,042426407	Ok
	Sy	1,28	*	1,28	#DIV/0!	Ok
	Lou	0,81	1,19	1	0,268700577	Ok
	Hr	0,81	1,07	0,94	0,183847763	Ok
	Vu	0,62	0,49	0,555	0,091923882	↓
Fêmeas sadias acima de quatro anos	An	1,45	1,23	1,34	0,155563492	Ok
	So	1,96	1,54	1,75	0,296984848	Ok
	Jy	0,47	*	0,47	#DIV/0!	↓
	At	1,59	1,64	1,615	0,035355339	Ok
	Se	0,46	0,55	0,505	0,06363961	↓
Fêmeas portadoras acima de quatro anos	3R4	0,96	1,05	1,005	0,06363961	Ok
	3R3	1,2	1,42	1,31	0,155563492	Ok
	I3	0,87	1,08	0,975	0,148492424	Ok
	2R6	1,03	1,15	1,09	0,084852814	Ok
	2R3	1,21	1,19	1,2	0,014142136	Ok
	4B6	0,85	0,83	0,84	0,014142136	Ok
	3B5	0,85	1,03	0,94	0,127279221	Ok
Fêmeas afetadas de um a três anos	1K1	0,9	1,14	1,02	0,169705627	Ok
	1K3	1,48	1,32	1,4	0,113137085	Ok
	3L2	0,75	1,45	1,1	0,494974747	Ok
	3L1	0,81	1,24	1,025	0,304055916	Ok
	3H6	0,82	1,1	0,96	0,197989899	Ok
Machos sadios de um a três anos	Ru	0,46	1,34	0,9	0,622253967	Ok
	Bn	0,57	0,64	0,605	0,049497475	↓
Machos sadios acima de quatro anos	Jx	0,64	0,61	0,625	0,021213203	↓
	Fs	0,66	0,38	0,52	0,197989899	↓
	Ca	0,49	0,54	0,515	0,035355339	↓
Machos afetados de um a três anos	1K6	0,8	0,92	0,86	0,084852814	Ok
	2Bi7	1,12	1,07	1,095	0,035355339	Ok
	2L2	1,08	0,93	1,005	0,106066017	Ok
	2L3	1,05	0,88	0,965	0,120208153	Ok
Machos afetados acima de quatro anos	C5	1,09	0,84	0,965	0,176776695	Ok
	I4	1,41	0,75	1,08	0,466690476	Ok
	M4	0,87	0,94	0,905	0,049497475	Ok
	M5	0,89	0,86	0,875	0,021213203	Ok

*Amostra inviável; ↓ valores da média abaixo dos valores de referência do T₄ livre; ↑ valores da média acima dos valores de referência; Ok valores da média correspondentes aos valores de referência. Valores de referência para o T₄ livre: 0,7 a 2,6ng/dL.

Figura 25 - Média dos níveis de T₄ livre por animal estudado e valores de referência. Demonstra-se o grupo GRf I (**amarelo**), GRf II (**verde claro**), Portadora II (**vermelho**), GRMDf I (**roxo**), GRm I (**verde escuro**), GRm II (**azul**), GRMDm I (**marrom**), GRMDm II (**laranja**), valores de referência (**preto**) mínimo (**Ref. Mín**) e máximo (**Ref. Máx**)

Figura 26 - Gráfico estatístico do nível de T₄ livre para os diferentes genótipos. Cães afetados (**Afetado**), cadelas portadoras (**Portadora**) e cães controle (**Sadio**), independente de idade e sexo

Nível de T4 livre (ng/dL) por genótipo, sexo e classe de idade

Figura 27 - Gráfico estatístico do nível de T₄ livre para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade. Fêmea afetada de um a três anos de idade (**Fêmea afetada A**), fêmea portadora acima de quatro anos (**Portadora B**), fêmea controle de um a três anos (**Fêmea sadia A**), fêmea controle acima de quatro anos (**fêmea sadia B**), macho GRMD de um a três anos (**Macho afetado A**), macho GRMD acima de quatro anos (**Macho afetado B**), macho controle de um a três anos (**Macho sadio A**) e macho controle acima de quatro anos de idade (**Macho sadio B**)

6.2.3.4 TSH

Foram feitas duas coletas do material biológico sanguíneo de cada animal estudado. Os valores para os níveis de TSH de cada animal (Figura 28), assim como a média das duas coletas e o desvio padrão encontram-se na tabela 5.

Média igual a 0.0667 ng/mL (± 0.0198). As análises de variância (ANOVA) realizadas para os valores de TSH indicaram que houve diferenças significativas entre os genótipos ($F_{2,32}=3.6776$, $p=0.0365$, Figura 29), mas não entre os genótipos, sexo e classes de idade ($F_{7,27}=2.1563$, $p=0.0714$, Figura 31).

O teste de Tukey para os valores de TSH apontou diferenças significativas entre os genótipos portadora e afetado (0.02049 ± 0.02122). Os valores de TSH das portadoras foram maiores (0.08357 ± 0.01574) do que dos afetados (0.06307 ± 0.0206).

A diferença entre os genótipos considerando o sexo do animal (Figura 30) mostrou-se significativo entre os valores dos “machos sadios” e as “fêmeas portadoras” ($p=0.0336 \pm 0.03044$, 0.025), sendo que os machos sadios apresentaram valores menores (0.05 ± 0.0117) do que as fêmeas portadoras (0.0836 ± 0.0157).

Tabela 5 - Valores dos níveis de TSH de duas coletas sanguíneas com sua média, desvio padrão e comparação da média com valores de referência, para cada animal

Genótipo e classes de Idade	Animal	TSH (ng/mL) 1 ^a coleta	TSH (ng/mL) 2 ^a coleta	Média (ng/mL)	Desvio Padrão	Comparação com valores de referência
Fêmeas sadias de um a três anos	Sr	0,07	0,07	0,07	0	↓
	Sy	0,07	*	0,07		↓
	Lou	0,05	0,07	0,06	0,014142136	↓
	Hr	0,07	0,1	0,085	0,021213203	↓
	Vu	0,06	0,07	0,065	0,007071068	↓
Fêmeas sadias acima de quatro anos	An	0,09	0,05	0,07	0,028284271	↓
	So	0,06	0,06	0,06	0	↓
	Jy	0,05	*	0,05		↓
	At	0,09	0,12	0,105	0,021213203	Ok
	Se	0,04	0,05	0,045	0,007071068	↓↓
Fêmeas portadoras acima de quatro anos	3R4	0,12	0,06	0,09	0,042426407	↓
	3R3	0,07	0,07	0,07	0	↓
	I3	0,07	0,08	0,075	0,007071068	↓
	2R6	0,04	0,12	0,08	0,056568542	↓
	2R3	0,05	0,12	0,085	0,049497475	↓
	4B6	0,08	0,06	0,07	0,014142136	↓
	3B5	0,08	0,15	0,115	0,049497475	Ok
Fêmeas afetadas de um a três anos	1K1	0,1	0,08	0,09	0,014142136	↓
	1K3	0,02	0,05	0,035	0,021213203	↓↓
	3L2	0,05	0,06	0,055	0,007071068	↓
	3L1	0,07	0,05	0,06	0,014142136	↓
	3H6	0,06	0,05	0,055	0,007071068	↓
Machos sadios de um a três anos	Ru	0,04	0,06	0,05	0,014142136	↓
	Bn	0,06	0,08	0,07	0,014142136	↓
Machos sadios acima de quatro anos	Jx	0,04	0,05	0,045	0,007071068	↓↓
	Fs	0,05	0,03	0,04	0,014142136	↓↓
	Ca	0,04	0,05	0,045	0,007071068	↓↓
Machos afetados de um a três anos	1K6	0,03	0,04	0,035	0,007071068	↓↓
	2Bi7	0,05	0,09	0,07	0,028284271	↓
	2L2	0,04	0,06	0,05	0,014142136	↓
	2L3	0,07	0,07	0,07	0	↓
Machos afetados acima de quatro anos	C5	0,05	0,04	0,045	0,007071068	↓↓
	I4	0,06	0,07	0,065	0,007071068	↓
	M4	0,06	0,13	0,095	0,049497475	↓
	M5	0,07	0,12	0,095	0,035355339	↓

*Amostra inviável; ↓ valores da média abaixo dos valores de referência; ↓↓ bem abaixo; ↑ valores da média acima dos valores de referência; Ok valores da média correspondentes aos valores de referência. Valores de referência para o TSH: 0,1 a 0,5ng/mL.

Figura 28 - Média dos níveis de TSH por animal estudado e valores de referência. Demonstra-se o grupo GRf I (**amarelo**), GRf II (**verde claro**), Portadora II (**vermelho**), GRMDf I (**roxo**), GRm I (**verde escuro**), GRm II (**azul**), GRMDm I (**marrom**), GRMDm II (**laranja**), valores de referência (**preto**) mínimo (**Ref. Mín**) e máximo (**Ref. Máx**)

Figura 29 - Gráfico estatístico do nível de TSH para os diferentes genótipos. Cães afetados (**Afetado**), cadelas portadoras (**Portadora**) e cães controle (**Sadio**), independente de idade e sexo

Figura 30 - Gráfico estatístico do nível de TSH para os diferentes genótipos e sexo. Gráfico independente da idade dos animais

Figura 31 - Gráfico estatístico do nível de TSH para os diferentes genótipos, sexo e classe de idade. Fêmea afetada de um a três anos de idade (**Fêmea afetada A**), fêmea portadora acima de quatro anos (**Portadora B**), fêmea controle de um a três anos (**Fêmea sadia A**), fêmea controle acima de quatro anos (**fêmea sadia B**), macho GRMD de um a três anos (**Macho afetado A**), macho GRMD acima de quatro anos (**Macho afetado B**), macho controle de um a três anos (**Macho sadio A**) e macho controle acima de quatro anos de idade (**Macho sadio B**)

6.2.3.5 Análise da função da tireóide através dos resultados laboratoriais

Para verificar a função da tireóide, as médias dos resultados de T₃ total, T₄ total, T₄ livre e TSH foram analisadas em comparação com os valores de referência utilizados no laboratório Provet® (Quadro 5).

Genótipo e classes de Idade	Animal	Média T ₃ total (ng/mL)	Média T ₄ total (µg/dL)	Média T ₄ livre (ng/dL)	Média TSH (ng/mL)	Diagnóstico para a tireóide
Fêmeas saudáveis de um a três anos	Sr	0,705 ok	2,84 ok	1,47 Ok	0,07 -	Resultados não afirmativos
	Sy	0,51 -	1,88 Ok	1,28 Ok	0,07 -	Resultados não afirmativos
	Lou	0,685 Ok	1,915 Ok	1 Ok	0,06 -	Resultados não afirmativos
	Hr	0,605 Ok	2,145 Ok	0,94 Ok	0,085 -	Resultados não afirmativos
	Vu	0,7 Ok	1,505 Ok	0,555 -	0,065 -	Hipotireoidismo secundário
Fêmeas saudáveis acima de quatro anos	An	0,655 ok	2,005 Ok	1,34 Ok	0,07 -	Resultados não afirmativos
	So	0,72 Ok	2,685 Ok	1,75 Ok	0,06 -	Resultados não afirmativos
	Jy	0,57 -	1,01 -	0,47 -	0,05 -	Hipotireoidismo secundário
	At	0,71 Ok	2,685 Ok	1,615 Ok	0,105 Ok	Normal
	Se	0,425 -	1,305 -	0,505 -	0,045 -	Hipotireoidismo secundário
Fêmeas portadoras acima de quatro anos	3R4	0,585 -	2,09 Ok	1,005 Ok	0,09 -	Resultados não afirmativos
	3R3	0,49 -	2,025 Ok	1,31 Ok	0,07 -	Resultados não afirmativos
	I3	0,5 -	2,04 Ok	0,975 Ok	0,075 -	Resultados não afirmativos
	2R6	0,715 Ok	2,145 Ok	1,09 Ok	0,08 -	Resultados não afirmativos
	2R3	0,945 Ok	2,725 Ok	1,2 Ok	0,085 -	Resultados não afirmativos
	4B6	0,735 Ok	1,78 Ok	0,84 Ok	0,07 -	Resultados não afirmativos
	3B5	0,78 Ok	1,8 Ok	0,94 Ok	0,115 Ok	Normal
Fêmeas afetadas de um a três anos	1K1	1,035 ok	2,95 ok	1,02 ok	0,09 -	Resultados não afirmativos
	1K3	0,825 Ok	2,935 Ok	1,4 Ok	0,035 -	Resultados não afirmativos
	3L2	0,485 -	2,23 Ok	1,1 Ok	0,055 -	Resultados não afirmativos
	3L1	0,635 Ok	2,31 Ok	1,025 Ok	0,06 -	Resultados não afirmativos
	3H6	0,53 Ok	2,12 Ok	0,96 Ok	0,055 -	Resultados não afirmativos
Machos saudáveis de um a três anos	Ru	0,685 Ok	1,575 Ok	0,9 Ok	0,05 -	Resultados não afirmativos
	Bn	0,68 Ok	1,53 Ok	0,605 -	0,07 -	Hipotireoidismo secundário
Machos saudáveis acima de quatro anos	Jx	0,73 Ok	1,5 Ok	0,625 -	0,045 -	Hipotireoidismo secundário
	Fs	0,715 Ok	1,475 Ok	0,52 -	0,04 -	Hipotireoidismo secundário
	Ca	0,485 -	0,975 Ok	0,515 -	0,045 -	Hipotireoidismo secundário
Machos afetados de um a três anos	1K6	0,595 -	1,905 Ok	0,86 Ok	0,035 -	Resultados não afirmativos
	2Bi7	0,57 -	2,27 Ok	1,095 Ok	0,07 -	Resultados não afirmativos
	2L2	0,515 -	2,235 Ok	1,005 Ok	0,05 -	Resultados não afirmativos
	2L3	0,57 -	2,29 Ok	0,965 Ok	0,07 -	Resultados não afirmativos
Machos afetados acima de quatro anos	C5	0,505 -	2,125 Ok	0,965 Ok	0,045 -	Resultados não afirmativos
	I4	0,495 -	2,17 Ok	1,08 Ok	0,065 -	Resultados não afirmativos
	M4	0,445 -	2,27 Ok	0,905 Ok	0,095 -	Resultados não afirmativos
	M5	0,455 -	1,88 ok	0,875 ok	0,095 -	Resultados não afirmativos

Ok: valores dentro dos limites dos valores de referência. -: valores abaixo dos valores de referência. Valores de Referência: T₃ total= 0,6-1,4ng/mL; T₄ total= 1,5-3,8µg/dL; T₄ livre= 0,7-2,6ng/dL; TSH= 0,1-0,5ng/mL.

Quadro 5 - Análise da função da tireóide através dos resultados dos níveis de T₃ total, T₄ total, T₄ livre e TSH

6.3 Imuno- histoquímica

Os cortes histológicos das adrenais e tireóides do cão sadio 1S foram inseridos em lâminas sinalizadas e foram submetidos à análise da expressão da distrofina juntamente com cortes histológicos de músculo esquelético do mesmo cão controle (Figuras 32A e 32B) para que uma comparação com relação a ação e diluição dos reagentes fosse realizada, assim como a marcação positiva ou negativa de distrofina.

No cão sadio, encontrou-se a marcação positiva evidenciada em marrom no músculo esquelético, sendo assim, há a presença de distrofina neste tipo de tecido.

Figura 32 - Imuno- histoquímica, com diluição 1:20, para a localização da distrofina em cortes transversais de músculo esquelético de cão sadio. Em (A) e (B) observamos a marcação da distrofina em marrom (**setas**) na periferia da membrana sarcoplasmática das fibras musculares esqueléticas

6.3.1 Imuno- histoquímica na adrenal do cão controle

A diluição inicial (1:20) que detecta positivamente a distrofina para a musculatura esquelética não detectou a proteína na glândula adrenal do cão controle (Figuras 33A e 33B), sendo assim, foi realizada uma diluição com concentração mais alta (1:10) para a análise da expressão da distrofina (Figuras 34A, 34B, 34C e 34D), que apresentou o mesmo resultado. Sendo

assim, não foi realizada a técnica de imuno- histoquímica da distrofina nas adrenais dos cães GRMD, já que nos animais saudáveis essa marcação não ocorreu o que de forma semelhante iria acontecer nos animais distróficos.

Figura 33 - Imuno- histoquímica, com diluição 1:20, da adrenal de cão 1S. A figura (A) contém o anticorpo para distrofina, enquanto que a figura (B) é o controle negativo que evidencia o resultado negativo

Figura 34 - Imuno- histoquímica, com diluição 1:10, da adrenal de cão 1S. A figura (A) contém o anticorpo para distrofina, enquanto que a figura (B) é o controle negativo que evidencia resultado negativo para uma diluição mais concentrada do marcador

6.3.2 Imuno- histoquímica na tireóide do cão controle

Para a avaliação de presença ou ausência da proteína distrofina, foi feita a reação de imuno-histoquímica conforme a realizada para os cortes histológicos de músculo esquelético (1:20) (Figuras 35A e 35B). Como não houve a marcação, confirmou-se a ausência da distrofina concentrando a diluição em 50% (1:10) (Figuras 36A e 36B).

A expressão da distrofina foi negativa para ambas as diluições, mostrando-se ausente na glândula tireóide de cães saudáveis, sendo assim, não houve a necessidade de realização desta técnica nas tireóides dos cães GRMD.

Figura 35 - Imuno- histoquímica, com diluição 1:20, da tireóide de cão 1S. A figura (A) contém o anticorpo para distrofina, enquanto que a figura (B) é o controle negativo que evidencia resultado negativo para presença de distrofina

Figura 36 - Imuno- histoquímica, com diluição 1:10, da tireóide de cão 1S. A figura (A) contém o anticorpo para distrofina, enquanto que a figura (B) é o controle negativo que evidencia resultado negativo para presença de distrofina

7 DISCUSSÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) constitui um distúrbio genético, de caráter recessivo, com alta taxa de mutação em um gene localizado no braço curto do cromossomo X, em uma região denominada Xp21, (YIU; KORNBERG, 2008; CAROMANO, 1999), responsável pela produção de uma proteína essencial para o bom funcionamento muscular, a distrofina.

Várias são as alterações que podem ocorrer em pacientes distróficos em sistemas de órgãos musculares, como no músculo esquelético, e não musculares, como aumento da tensão na veia porta hepática, flacidez da parede da vesícula biliar ocasionada pela ausência do gene da distrofina em camundongos *mdx*. Além disso, também relataram síndrome de má absorção e processos diarréicos atribuídos à disfunção pancreática em humanos (NOWAK; IONASESCU; ANURAS, 1982; BAROHN et al., 1988; MIYATAKE et al., 1989; MORIUCHI et al., 1991; BERRY; GASCHEN; ACKERMAN, 1992; BRAZEAU; MATHEW; ENTRIKIN, 1992; STEIN; TIPINIS; SCHULTZ, 2002; GRANDO et al., 2009).

Os glicocorticóides, principalmente o cortisol, tem um efeito profundo no metabolismo de carboidratos, como também no de proteínas e lipídios. Em órgãos periféricos diminuem a atividade sintética e promovendo a degradação de proteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Portanto, alterações nos níveis séricos de cortisol podem causar síndromes multisistêmicas, devido aos efeitos sobre a grande maioria dos sistemas.

As glândulas adrenais são responsáveis pela secreção de esteróides que podem ser divididos em glicocorticóides, mineralcorticóides e andrógenos, de acordo com suas ações fisiológicas principais. Estes hormônios atuam no organismo de forma variada e alterações na sua produção ou excreção podem resultar em diversos distúrbios, como o hipoadrenocorticismismo e o hiperadrenocorticismismo. O hipoadrenocorticismismo é uma síndrome resultante da deficiência de secreção de glicocorticóides ou mineralocorticóides. O hiperadrenocorticismismo é um distúrbio associado com taxas excessivas de glicocorticóides endógenos ou exógenos, caracterizada por poliúria e

polidipsia, alopecia simétrica bilateral, pele adelgada e hipotônica, e redução da musculatura esquelética (KIRK; MULLER; SCOTT, 1985).

Uma das principais características da distrofia muscular progressiva que os GRMD apresentam (CAROMANO, 1999; SOUZA; MELO, 2000) e do hiperadrenocorticismo é a redução da contratilidade e volume da musculatura esquelética (KIRK; MULLER; SCOTT, 1985).

O hiperadrenocorticismo, nos cães, atua alterando o estado da tireóide, diminuindo os níveis de T_4 total e no T_3 total que são causadas pela síndrome do eutireóideo doente ou através de uma resposta ao estímulo do TSH que é atenuada como resultado da inundação dos tireotrofos hipofisários pelos adrenocorticotrofos (CUNNINGHAM, 2004).

A tireóide é uma glândula endócrina de origem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Sua principal função é sintetizar os hormônios tireoideanos tetraiodotironina ou tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3), que controlam a taxa de metabolismo do corpo, mantendo crescimento e desenvolvimento normal, bem como a temperatura corporal e os níveis energéticos dentro de sua taxa normal (KATZUNG, 2006).

Para a avaliação de possíveis interferências destes hormônios (T_3 , T_4 , TSH e cortisol) na evolução do quadro da distrofia muscular, as glândulas relacionadas, adrenais e tireóides, de cão controle e de GRMD, assim como seus hormônios foram analisados.

Os achados deste trabalho demonstraram a morfologia inalterada de todos os cães estudados, mas com diferenças estatísticas entre algumas dosagens hormonais citadas de animais saudáveis e de portadores da distrofia muscular progressiva (GRMD).

7.1 A adrenal e o cortisol

Os glicocorticóides, principalmente o cortisol, tem um efeito profundo no metabolismo de carboidratos, como também no de proteínas e lipídios. Em órgãos periféricos, produzem efeito oposto, catabólico, diminuindo a atividade sintética e promovendo a degradação de proteínas e de lipídios (BANKS, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O estudo das adrenais dos Golden Retriever

Muscular Dystrophy (GRMD) foi conduzido devido à capacidade desta glândula, mediante a liberação de glicocorticóides como o cortisol, em controlar o metabolismo das proteínas, podendo desta forma, atuar como um fator importante para a redução da progressão da doença.

Segundo McGavin e Zachary (2009) a glândula adrenal dos mamíferos é composta por duas partes distintas que diferem morfológicamente, funcionalmente e ainda por sua origem embrionária onde o córtex adrenal desenvolve-se a partir do epitélio celômico que tem origem mesodérmica e a medular deriva do ectoderma da crista neural. Nos cães analisados, observamos que as glândulas adrenais dispunham da mesma localização descrita por Anderson e Anderson (1994), Getty (1986) e Adam, Dawborn e Rosenbaum (1970). As características macroscópicas relacionadas ao córtex da adrenal dos GRMD e do cão controle correspondem às descrições de McGavin e Zachary (2009), deixando evidente que não existem diferenças macroscópicas entre cães sadios e distróficos quanto à anatomia e características da glândula adrenal. As estruturas envoltórias, vasculares e as subdivisões citadas por Banks (1992) corroboram com os achados deste trabalho.

Berry, Gaschen e Ackerman (1992) encontraram alterações radiográficas e ultrassonográficas em vários órgãos de felinos com distrofia muscular hipertrófica, denominada HFMD (Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy), também considerada análoga à DMD e GRMD, uma vez que ocorre a ausência de distrofina nos músculos (MCKERRELL, 2004). Embora Pillers et al. (1990) e Muscatelli et al. (1994) relatem a possibilidade da hipoplasia congênita da glândula adrenal em pacientes DMD e Carpenter et al. (1989) e Berry, Gaschen e Ackerman (1992) tenham observado a presença de mineralização das glândulas adrenais em dois felinos distróficos, Grando et al. (2009), detectou esta alteração apenas em um cão GRMD adulto afetado, que apresentava alteração na glândula adrenal direita (medindo 4,1 x 2,1cm). Os resultados encontrados neste trabalho não confirmam as alterações citadas, já que as adrenais de todos os cães afetados pela distrofia muscular encontravam-se similares às adrenais do cão sadio.

O ponto de vista microscópico apresentados por Banks (1992), Cunningham (2004) e McGavin e Zachary (2009) corroboram com a histologia

encontrada nos cães GRMD e no cão que segue padrões clínicos de normalidade relacionados com a ausência da distrofia muscular degenerativa, utilizados como controle.

As ultra-estruturas encontradas nas células das adrenais dos animais controle e afetados pela distrofia muscular progressiva foram as mesmas encontradas na maioria das células do organismo, como retículo endoplasmático granuloso, complexo de Golgi, lisossomos, mitocôndrias, membrana celular, núcleo, dentre outras (GARTNER; HIATT, 2002).

As propriedades antiinflamatórias dos glicocorticóides são funções importantes de estabilização das membranas lisossômicas, diminuindo a síntese de colágeno (BANKS, 1992). No estudo realizado, houve semelhante marcação de colágeno nos animais afetados e nos animais controle.

Dentre as funções dos glicocorticóides, encontra-se sua capacidade antiinflamatória, principalmente do cortisol (BANKS, 1992, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O processo de inflamação é importante para o encapsulamento e a destruição de agentes nocivos sistêmicos, mas, como consequência, frequentemente, há a perda da função por ocorrer substituição do tecido funcional por tecido fibroso (CUNNINGHAM, 2004; MCGAVIN & ZACHARY, 2009). Durante a evolução das distrofias musculares, as fibras que atingem o estágio de degeneração são gradualmente substituídas por tecido conjuntivo fibroso e adiposo (KORNEGAY et al., 1994; CHILDERS et al., 2002; NGUYEN et al., 2002).

Johansson et al. (2000) demonstrou, em pacientes com excesso de tecido adiposo e com a distrofia miotônica, que o ritmo diurno do cortisol sérico é aumentado devido ao aumento da concentração plasmática de citocinas séricas. No presente estudo, não houve aumento na média dos níveis de cortisol em nenhum animal estudado, tanto sadios, quanto portadoras e afetados pela distrofia muscular degenerativa.

O grande “pool” de hormônios, como o cortisol, ligados a proteínas no estado gestacional proporciona, aos mamíferos, uma reserva para ajustes no momento de liberação hormonal para promover a atividade biológica. A quantidade total de cortisol é analisada a partir do plasma, sendo assim, as concentrações podem não estar somente relacionadas com a taxa de

secreção, mas também podem ser influenciadas pela quantidade de proteínas plasmáticas com sítios de ligação aos glicocorticóides (CUNNINGHAM, 2004). Duas das cadelas normais do estudo, a Hr e Vu, realizaram cópula e, possivelmente, devido a isto, o valor de cortisol plasmático de uma delas (Vu) encontrou-se aumentado na primeira coleta, o que indicou a possibilidade de prenhez. Este resultado não foi confirmado na segunda coleta desta mesma fêmea, pois o nível de cortisol encontrou-se abaixo da normalidade.

O presente estudo demonstrou que 100% das fêmeas afetadas, 100% dos machos afetados com idade de um a três anos e 50% dos machos afetados com idades acima de quatro anos apresentaram as médias nos níveis de cortisol abaixo da faixa de normalidade, sendo que 50% dos machos afetados acima de quatro anos de idade apresentaram essas médias dentro do limite de normalidade. Dentre as portadoras (85,72%), 60% das cadelas sadias com idades de um a três anos e 40% das cadelas sadias acima de quatro anos de idade, 50% dos machos sadios de um a três anos de idade e 33,33% dos machos sadios acima de quatro anos de idade apresentaram as médias nos níveis de cortisol dentro da faixa de normalidade e o restante apresentou estes valores abaixo do limite de normalidade. O aumento do volume e diminuição da concentração urinária encontrado por Gatti (2007) em GRMD não se relacionam com altos níveis de cortisol (hiperadrenocorticism), pois estes níveis encontraram-se entre normais e abaixo da normalidade, em todos os animais estudados. Este alto nível de diurese, apresentada pelos GRMD, possivelmente se deve a dificuldade na manutenção da omeostase hídrica (GATTI, 2007).

Estatisticamente, os grupos não apresentaram diferenças significantes entre si. Analisando somente os genótipos (afetados, portadoras e sadios), independente dos subgrupos de sexo e classes de idades, encontramos diferenças estatísticas sendo que as portadoras apresentaram maiores médias nos níveis de cortisol, comparadas aos animais afetados, apresentando os menores níveis do hormônio.

Um estudo realizado por Byers, Kunkel e Watkins (1991) utilizando um anticorpo altamente sensível e específico foi utilizado para caracterizar a distribuição da distrofina na musculatura esquelética, cardíaca e lisa. Elevada concentração de distrofina apareceu na membrana celular da fibra muscular

esquelética, assim como em junções neuromusculares. No músculo cardíaco a distribuição era bem marcada na membrana celular da fibra, mas notavelmente ausente nas junções dos discos intercalados, enquanto que na musculatura lisa, a marcação da membrana plasmática apresentou-se muito menos abundante, apresentando ao microscópio óptico um padrão descontínuo, do tipo listado. Com a realização de Imuno- histoquímica para a distrofina, o presente estudo demonstrou ausência desta proteína em adrenais de cães saudáveis, sendo assim desnecessária a realização deste ensaio para cães afetados pela distrofia muscular, já que esta proteína mostrou-se ausente nesta glândula.

De acordo com Hoffmann et al. (1988), todos os tipos de músculos expressam a distrofina. Com nosso estudo, concluímos que os cães afetados pela distrofia ou portadores do gene não apresentam alterações estruturais ou funcionais das glândulas adrenais.

7.2 A tireóide e os hormônios T₃ total, T₄ total, T₄ livre e o TSH

Danowski et al. (1956a, 1956b) e Mularek e Gembicki (1966) reportaram que distúrbios na função da tireóide pode ocorrer juntamente com progressivas distrofias musculares.

Anatomicamente, de acordo com George, Alves e Castro (1998) a localização da glândula tireóide é adiante da traquéia nos humanos e junto às artérias carótidas comuns ou às artérias carótidas externas e dos ramos das artérias subclávias em outros mamíferos, répteis e aves. Todos os animais estudados apresentaram a tireóide composta de dois lobos localizados bilateralmente à traquéia, na direção do primeiro anel traqueal se estendendo ao quinto ou sexto, assim como descrito por Cunningham (2004) à maioria dos mamíferos e por Done et al. (2009) e Novo, Carvalho e Alves (2009) aos cães especificamente.

A glândula tireóide humana é altamente vascularizada, de acordo com Koss (1992) assim como as tireóides caninas descritas por Anderson e Anderson (1994) e os achados deste trabalho no cão sadio e nos GRMD.

Evans (1993) afirma que as dimensões da glândula tireóide, em cães de porte médio, são de cerca de 5,0 cm de comprimento e 1,5 cm de largura. Getty (1986) e Nyland e Mattoon (1995) relataram que a tireóide apresenta de 2,5 a 3,0 cm de comprimento e 0,4 a 0,6 cm de largura. De Marco e Larsson (2006) descrevem os tamanhos das tireóides de cães com hipotireoidismo, com as mesmas medidas de Getty (1986) e Nyland e Mattoon (1995). Nossos achados morfológicos para os GRMD estudados e para o cão controle correspondem aos tamanhos das glândulas citados por Getty (1986), Nyland e Mattoon (1995) e De Marco e Larsson (2006) para cães de grande porte. Para os afetados e controle não foi possível estabelecer uma padronização quanto ao dimensões entre os pares de glândula, visto que alguns apresentaram a tireóide direita e esquerda com o mesmo tamanho, e outros com tamanhos variados, contrapondo com a descrição de Novo, Carvalho e Alves (2009), que relatou que a direita é menor que a esquerda em cães.

As descrições histológicas das glândulas tireóideas dos grupos de cães estudados neste trabalho corroboram com as apresentadas por Banks (1992), Cunningham (2004), Junqueira e Carneiro (2004) e McGavin e Zachary (2009) sendo que há a presença de cápsula, das células foliculares, do colóide e, fora do ambiente do ambiente folicular, das células parafoliculares. O colóide que contém proteínas, glicoproteínas e enzimas, geralmente, é acidófilo e, portanto PAS positivas (BANKS, 1992). A marcação positiva por PAS também foi encontrada em animais afetados e no cão controle.

Em cortes histológicos, as células dos folículos variam de cubóides, quando a secreção é basal, a alongadas, quando as células são estimuladas a liberar hormônios e os folículos mostram diâmetros muito variáveis (CUNNINGHAM, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Nos cortes histológicos analisados, em microscopia de luz e eletrônica de transmissão, os animais afetados pela distrofia muscular apresentaram grande quantidade de células foliculares alongadas enquanto que nos animais sadios havia predominância de células cubóides. Este fato se deve ao estado funcional da glândula, ou seja, nos cortes analisados, as células foliculares dos cães afetados apresentaram maior atividade do que as mesmas células do animal sadio.

Gartner e Hiatt (2002) consideram algumas ultraestruturas presentes na maioria das células do organismo, como retículo endoplasmático granuloso, Golgi, lisossomos, mitocôndria, entre outras. As células foliculares das tireóides caninas apresentam estas ultraestruturas (BANKS, 1992; MCGAVIN e ZACHARY, 2009). Corroborando com os autores, estas estruturas histológicas também foram observadas, tanto no animal sadio quanto nos animais afetados pela distrofia muscular progressiva, através da microscopia eletrônica de transmissão.

Dentre as alterações clínicas, relacionadas à secreção hormonal através da tireóide, encontra-se a cardiomiopatia (HUNTER, 1980; KLEIN; LEVEY, 1984), alteração do músculo respiratório (diafragma) (SCHLENKER; BURBACH, 1991) e deficiência na musculatura esquelética (GUSTAFSON et al., 1965; BALDWIN et al., 1980). A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e seu modelo com semelhanças clínicas e genéticas, o Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), também apresentam alterações na musculatura cardíaca e diafragmática através da mutação no gene da proteína distrofina na superfície da membrana da célula muscular (HOWEL et al., 1997; COZZI et al., 2001; VAINZOF et al., 2008), além das alterações relatadas na musculatura esquelética (CAROMANO, 1999; SOUZA; MELO, 2000).

É sabido que em algumas pessoas que apresentam distúrbios na função da tireóide podem apresentar também síndromes miopáticas sintomáticas. Estas síndromes retrocedem ou diminuem após a normalização do metabolismo tireóideo (ILINA, 1961). Mularek e Gembicki (1966) constataram que pacientes portadores de distrofia muscular progressiva e da atrofia muscular proveniente de poliomelite apresentaram aumento na absorção da tireóide de ^{131}I . Porém, a conclusão foi que a presença de alterações na tireóide mediante as duas doenças é uma reação não- específica do metabolismo da tireóide e das alterações do metabolismo muscular. Os autores sugeriram a possibilidade que as alterações na função da tireóide são provenientes de reações hormonais induzidas a compensar as deficiências na função motora. Contrapondo com os autores, nenhum animal afetado pela distrofia muscular, avaliado neste estudo, apresentou alterações na função da tireóide.

A produção de T_3 ocorre tanto no interior da tireóide e quanto pela desiodação do T_4 por tecidos, como o tecido muscular esquelético (CUNNINGHAM, 2004). Os hormônios tireóideos agindo em conjunto com o hormônio do crescimento (GH) são fundamentais para o desenvolvimento normal (BANKS, 1992; CUNNINGHAM, 2004). Lima et al. (2007) concluiu que a partir do trigésimo mês de vida, os cães sadios apresentam maior taxa de crescimento do que os cães afetados (GRMD).

No estudo realizado, 80% das fêmeas sadias com idades de um a três anos apresentaram a média dos valores de T_3 total dentro da normalidade, sendo que apenas 20% deste grupo apresentou valor diminuído. Fêmeas sadias com idade acima de quatro anos (60%) apresentaram a média dos valores de T_3 total normais, sendo que 40% delas apresentaram estes valores diminuídos. As portadoras com idade acima de quatro anos (57,14%) apresentaram a média dos valores de T_3 total normais, sendo que 42,86% apresentara estes valores diminuídos. Entre as cadelas afetadas com idades de um a três anos, 40% apresentou a média dos níveis de T_3 total abaixo do limite da normalidade, sendo que 60% apresentou estes valores normais. Os machos sadios de um a três anos de idade, em sua totalidade, apresentaram valores normais para T_3 . Machos sadios com idade acima de quatro anos (33,33%) apresentaram valores diminuídos para a média dos níveis de T_3 total, sendo que 66,67% dos animais deste grupo apresentaram estes valores normais. Todos os GRMD machos (com idades de um a três anos e acima de quatro anos) apresentaram as médias nos níveis de T_3 total diminuídos. Todos os grupos não apresentam diferenças estatísticas entre si, o que não corrobora com os achados de Kopecky et al. (1986) revelaram que os níveis séricos de T_3 de hamsters miopáticos, em temperatura ambiente, foram inferiores do que os níveis dos hamsters controle.

A totalidade das fêmeas sadias com idades de um a três anos apresentaram valores de T_4 total dentro da normalidade. Fêmeas sadias com idade acima de quatro anos (60%) apresentaram a média dos valores de T_4 total normal e 40% com valores diminuídos. Os níveis séricos de T_4 total de todas as portadoras, todas as cadelas GRMD, todos os machos sadios de um a três anos de idade e para todos os GRMD machos apresentaram-se dentro da normalidade. Machos sadios acima de quatro anos de idade (33,33%)

apresentaram valores normais para T_4 total e 66,67% abaixo da normalidade. Estatisticamente, os níveis de T_4 total do grupo das fêmeas afetadas com idades de um a três anos é significativamente maior quando comparado ao grupo dos machos sadios com idades acima de quatro anos. Os outros grupos não diferem entre os citados e entre si. Com a junção dos grupos, indiferente de sexo e idade, diferenciando-se somente pelo genótipo, estatisticamente os animais sadios apresentam menos T_4 total do que os afetados. A presença de fatores que inibem a ligação de T_4 com a proteína TBG (Thyroxine binding globulin) podem resultar numa alteração da distribuição do hormônio aos tecidos, assim, a ocorrência em DMD pode ser composto por efeito prejudicial adicionado à lesão inicial (ASTROM; KUBELBERG; MULLER, 1961).

Somente 20% das fêmeas sadias com idades de um a três anos apresentaram valor de T_4 livre diminuído. Fêmeas sadias com idade acima de quatro anos (60%) apresentaram a média dos valores de T_4 livre normais. Os níveis séricos de T_4 livre de todas as portadoras e cadelas GRMD apresentaram valores dentro da normalidade. Metade dos machos sadios de um a três anos da idade apresentaram a média dos valores de T_4 livre abaixo da normalidade e a outra metade apresentou valores séricos normais. Todos os machos sadios mais velhos apresentaram valores diminuídos para T_4 livre. Todos os GRMD machos (com idades de um a três anos e acima de quatro anos) apresentaram as médias nos níveis de T_4 livre normais. Estatisticamente, os níveis de T_4 livre dos grupos apresentam-se estatisticamente semelhantes. Baixos níveis de tiroxina que alcancem os tecidos (T_4 livre) podem causar alterações miopatológicas em adultos (ASTROM; KUBELBERG; MULLER, 1961) e a deficiência durante a infância pode causar retardo no desenvolvimento intelectual (LARSEN; INGBAR, 1985).

A análise de dados realizada por John (1990) revelou que pacientes DMD mais novos (com idades entre 3 a 7 anos) tendem a ter um elevado T_4 total e T_4 livre quando comparados a pacientes mais velhos (com idades entre 7 e 11 anos). Sendo assim, o autor sugere uma eutireóide com a elevada exposição dos tecidos pelo T_4 , não corroborando com as conclusões de Borst, Eil e Burman (1983), que conclui que os níveis de T_4 total e T_4 livre poderiam estar aumentados em quatro pacientes DMD mais jovens devido a diminuição do metabolismo extratireoidal, a qual pode ser encontrada em doenças não

tireóideas. Estes achados correspondem parcialmente aos resultados deste trabalho, pois não houve diferença estatística entre os grupos para os níveis séricos de T_4 livre, mas houve diferença estatística entre cadelas GRMD mais novas quando comparadas a cães sadios mais velhos, sendo que as fêmeas mais novas apresentaram maiores valores para T_4 total do que machos mais velhos.

A síntese de T_4 e T_3 é dependente do hormônio tireotrófico (TSH) e da disponibilidade do iodeto (BANKS, 1992). A distrofia miotônica é outra doença neuromuscular que afeta a musculatura esquelética, cardíaca e lisa, além dos olhos e o sistema endócrino (HARPER, 1989; ROWLAND, 2000). Okumura et al. (2002) relatou fato isolado de um paciente com a distrofia miotônica. Este paciente apresentou uma aparente eutireóide com baixos níveis séricos de TSH, mas os níveis séricos de hormônios da hipófise apresentaram-se normais e as respostas aos estímulos apresentaram padrão normal. Sendo assim, estes dados sugerem que o paciente tem uma deficiência de TSH isolada. Outros estudos confirmaram que as concentrações dos hormônios da tireóide e o TSH, em pacientes com a distrofia miotônica, são normais (STEINBECK; CARTER, 1982; FUKAZAWA et al., 1990). Corroborando com o relato de Okumura et al. (2002), em apresentar alterações nos níveis de TSH, 94,29% de todos os animais estudados, independente de genótipo, sexo ou classe de idade apresentaram a média dos níveis de TSH sérico abaixo dos limites de normalidade. Somente uma cadela sadia e uma portadora, ambas com mais de quatro anos de idade, apresentaram estes valores normais. Estatisticamente, os grupos avaliados não apresentaram diferenças quando comparados entre si, mas com a junção de grupos, sendo separados pela genotipagem e sexo (fêmea sadia, fêmea portadora, fêmea afetada, macho sadio e macho afetado), constatamos que os machos sadios apresentam menores valores de TSH do que as fêmeas portadoras; o restante do grupo é similar entre si e entre ambos. Separando-se os grupos somente pela genotipagem (sadio, afetado e portadora), independente de sexo e idade, constatamos que houveram diferenças significativas para os genótipos: os valores dos níveis de TSH das portadoras apresentaram-se maiores do que os afetados, sendo que os níveis de TSH dos animais sadios são semelhantes a ambos, estatisticamente. De acordo com Cunningham (2004), doenças não tireóideas podem alterar as

concentrações de TSH endógeno tanto quando as concentrações de T₄ total e T₄ livre, portanto somente diminuição do TSH não é indicativo de doença na tireóide.

Em humanos, quando as concentrações de TSH estão aumentadas e as de T₄ livres estão diminuídas, a precisão do diagnóstico de hipotireoidismo é de aproximadamente 100%, enquanto que a avaliação de T₄ e T₃ total é utilizada para a diferenciação do hipotireoidismo da síndrome do eutireóideo doente. Pesquisas reportaram a presença de hipotireoidismo em modelos animais e pacientes humanos com distrofia muscular (SCHLENKER; BURBACH, 1991). Schlenker e Burbach (1995) encontraram que níveis de tiroxina em hamsters distróficos eram menores (pela metade) quando comparados a hamsters controle com um, quatro e doze meses de idade. Anormalidades no metabolismo da tireóide foram relatadas em camundongos distróficos (BORGMAN, 1965), galinhas (MARCH; BIELY; COATES, 1969; KING; ENTRIKIN, 1991) e em pacientes humanos (MULAREK; GEMBICKI, 1966; BRAHAM; SAROVA-PINHAIS; CZERNIAK, 1969; JOHN, 1990). Estes achados contrapõem a este estudo, pois não houve diagnóstico confirmativo, através de exames laboratoriais, para hipotireoidismo em cadelas portadoras ou cães e cadelas afetadas pela distrofia muscular. Somente foram encontradas alterações em 20% das cadelas sadias com idade de um a três anos, 40% das cadelas sadias com mais de quatro anos de idade, 50% dos machos sadios com idades de um a três anos e 100% dos machos sadios com mais de quatro anos de idade, que apresentaram hipotireoidismo secundário.

Sistemas de órgãos musculares e não musculares também podem estar alterados em humanos e animais distróficos. Estudos realizados discorreram sobre aumentos de tensão observados na veia porta hepática, bem como flacidez da parede da vesícula biliar ocasionada pela ausência do gene da distrofina em camundongos *mdx*. Além disso, também relataram síndrome de má absorção e processos diarreicos atribuídos à disfunção pancreática em humanos (NOWAK; IONASESCU; ANURAS, 1982; BAROHN et al., 1988; MIYATAKE et al., 1989; MORIUCHI et al., 1991; BERRY; GASCHEN; ACKERMAN, 1992; BRAZEAU; MATHEW; ENTRIKIN, 1992; STEIN; TIPNIS; SCHULTZ, 2002; GRANDO et al., 2009).

Sabe-se que a distrofina está associada com células cerebrais normais (CHELLY et al., 1988). As anormalidades das células cerebrais em DMD podem afetar o funcionamento do hipotálamo e consequentemente a tireóide de diferentes maneiras variando com o estágio da doença (JOHN, 1990). A reação de imuno-histoquímica da proteína distrofina na glândula tireóide de cão controle foi negativa, sendo assim, não se observou a presença de distrofina nesta glândula.

Sendo assim, concluímos que os cães afetados pela distrofia ou portadores do gene não apresentam alterações estruturais ou funcionais da tireóide, apesar de alguns animais e grupos apresentarem diferenças significativas de alguns hormônios relacionados à glândula.

8 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados deste estudo pode-se concluir que:

- Anatomicamente, as glândulas tireóide e adrenais encontravam-se localizadas de acordo com a literatura e com o animal controle. Cada adrenal situou-se sobre o pólo superior de cada rim e os dois lobos da tireóide situaram-se um de cada lado da traquéia.
- Morfologicamente, as glândulas adrenais dos GRMD encontravam-se homogêneas, com coloração esbranquiçada, como o animal controle e citações da literatura. Já as células foliculares das tireóides dos cães afetados estudados apresentaram formato alongado e do cão controle apresentaram formato cubóide.
- Todos os grupos apresentaram algum animal com baixos níveis séricos de cortisol, o que não caracteriza a doença distrofia muscular, assim como a ausência de alterações hormonais relacionadas ao hiperadrenocorticismos.
- Estatisticamente, encontramos diferenças nos níveis de cortisol entre os grupos das portadoras e dos afetados (independente de sexo e idade). As portadoras apresentaram maiores níveis hormonais do que os afetados.
- Não foram encontradas alterações na função da tireóide nos animais afetados pela distrofia muscular (GRMD).
- Não foram encontrados vestígios de distrofina nas glândulas adrenais e tireóide de cão controle em concentrações padrões e em altas concentrações, sendo assim, estas glândulas não apresentam esta proteína.

REFERÊNCIAS

ADAM, W. R.; DAWBORN, J. K.; ROSENBAUM, M. Transient early diastolic murmurs in patients with renal failure. **Medical Journal of Australia**, v. 2, n. 23, p. 1085-1086, 1970.

AMBRÓSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P.; MARTINS, D. S.; ARAÚJO, K. P.; ZUCCONI, E.; BROLIO, M. P.; GIGLIO, R. F.; MORINI, A. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R.; FEITOSA, M. L.; VALADARES, M. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. **Genetics and Molecular Research**, v.8, n. 2, p. 389-396, 2009.

ANDERSON, W. D.; ANDERSON, B. G. **Atlas of canine anatomy**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1994. p. 375-383, 726-48.

ANSVED, T. Muscular dystrophies: influence of physical conditioning on the disease evolution. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 4, p. 435-439, 2003.

ASTROM, K. E.; KUGELBERG, E.; MULLER, R. Hypothyroid myopathy. **Archives of Neurology**, v. 5, p. 472-482, 1961.

BALDWIN, K. M.; HOOKER, A. M.; HERRICK, R. F.; SCHRADER, L. F. Respiratory capacity and glycogen depletion in thyroid deficient muscle. **Journal of Applied Physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**. v. 49, n. 1, p. 102-106, 1980.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Editora Manole, 1992. p. 529-540.

BANKS, G. B.; CHAMBERLIAN, J. S. The value of mammalian models for Duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 84, p. 431-453, 2008.

BAROHN, R. J.; LEVINE, E. J.; OLSON, J. O.; MENDELL, J. R. Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 1, p. 15-18, 1988.

BEENAKKER, E. A. C.; FOCK, J. M.; VAN TOL, M. J.; MAURITS, N. M.; KOOPMAN, H. M.; BROUWER, O. F.; VAN DER HOEVEN, J. H. Intermittent prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy: a randomized controlled trial. **Archives Neuronal**, v. 62, n. 1, p. 128-132, 2005.

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

BERRY, C. R.; GASCHEN, F. P.; ACKERMAN, N. Radiographic and ultrasonographic features of hypertrophic feline muscular dystrophy in two cats. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 33, n. 6, p. 357-364, 1992.

BIGGAR, W. D.; KLAMUT, H. J.; DEMACIO, P. C.; STEVENS, D. J.; RAY, P. N. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n. 401, p. 88-106, 2002.

BORGMAN, R. F. The behavior of iodine-131 in the muscle of mice with hereditary muscular dystrophy as affected by age, certain pharmacologic agents, and other factors. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 169-173, 1965.

BORST, G. C.; EIL, C.; BURMAN, K. D. Euthyroid hyperthyroxinemia. **Annals of internal medicine**, v. 98, n. 3, p. 366-378, 1983.

BRAHAM, J.; SAROVA-PINHAIS, I.; CZERNIAK, P. Radioisotope studies of thyroid function in progressive muscular dystrophy. **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 6, p. 1188-1191, 1969.

BRAZEAU, G. A. MATHEW, M.; ENTRIKIN, R. K. Serum and organ indices of the mdx dystrophic mouse. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 179-189, 1992.

BYERS, T. J.; KUNKEL, L. M.; WATKINS, S. C. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. **The Journal of Cell Biology**, v. 115, n. 2, p. 411-421, 1991.

CAPPEN, C. C. The endocrine gland. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 306-328.

CAROMANO, F. A. Características do portador de distrofia muscular de Duchenne: Revisão. **Arquivos de Ciência da Saúde da UNIPAR**, v. 3, n. 3, p. 211-218, 1999.

CARPENTER, J. L.; HOFFMAN, E. P.; ROMANUL, F. C.; KUNKEL, L. M.; ROSALES, R. K.; MA, N. S.; DASBACH, J. J.; RAE, J. F.; MOORE, F. M.; MCAFEE, M. B. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. **American Journal Pathology**, v. 135, n. 5, p. 909-919, 1989.

CHARGÉ, S. B; RUDNICK, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.

CHELLY, J., KAPLAN, J. C., MAIRE, P. GAUTRON, S. KAHAN, A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. **Nature**, v. 333, n. 6176, p. 858-860, 1988.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; SULLIVAN, M. J.; KORNEGAY, J. N. Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 80, n. 3, p. 175- 181, 2001.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; PETROSKI, G. F.; MCDONALD, K.; KORNEGAY, J. N. Eccentric contractin injury in dystrophic canine muscle. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 83, n. 11, p. 1572- 1578, 2002.

CHILDERS, M. K.; STALEY, J. T.; KORNEGAY, J. N.; MCDONALD, K. S. Skinned single fibers from normal and dystrophin- deficient dogs incur comparable strech- induced force deficits. **Muscle and Nerve**, v. 31, n. 6, p. 768-771, 2005.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne´s muscular dystrophy: animal model used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, n. 4, p. 165-172, 2003.

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

COYNE, C. P. **Comparative disgnostic pharmacology**: clinical and research applications in living- system models. Iowa USA: Blackwell Publishing Professional, 2006. p. 111-112, 131, 134-136, 163-164, 171-176, 603-606, 626-627, 661-662, 677.

COZZI, F.; CERLETTI, M.; LUVONI, G. C.; LOMBARDO, R.; BRAMBILLA, P. G.; FAVERZANI, S.; BLASEVICH, F.; CORNELIO, F.; POZZA, O.; MORA, M. Development of muscle pathology in canine x- linked muscular dystrophy II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. **Acta Neuropathologica**, v.101, n. 5, p. 469-478, 2001.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 596 p.

DANOWSKI, T. S.; WIRTH, P. M.; LEINBERGER, M. H.; RANDOLK, L. A.; PETERS, I. H. Muscular Dystrophy. II. Endocrine studies. **A.M.A. Journal of Diseases of Children**, v. 91, n. 4, p. 346-355. 1956a.

DANOWSKI, T. S.; BARTIANI, R. M.; MCWILLIAMS, F. D.; MATTER, F. M.; GREEMANN, R. Muscular Dystrophy. III. Endocrine studies. **A.M.A. Journal of Diseases of Children**, v. 91, n. 4, p. 356-364, 1956b.

DE MARCO, V.; LARSSON, C. E. Hipotireoidismo na espécie canina: Avaliação da ultrassonografia cervical como metodologia diagnóstica. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 747-753, 2006.

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

DEMOS, J. Results of the treatment of Duchenne de Boulogne myopathy by early physiotherapy. A comparative study with untreated subjects. **Archives Françaises de Pédiatrie**, v. 40, n. 8, p. 609-613, 1983.

DONE, S. H.; GOODY, P. C.; EVANS, S. A.; STICKLAND, N. C. **Atlas colorido de anatomia veterinária do cão e do gato**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 527p.

EVANS, H. E. **Miller's: anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. 1113 p.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Hypothyroidism. In: _____ **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3. ed. Missouri: Elsevier, 2004. 86-218.

FUKAZAWA, H.; SAKURADA, T.; YOSHIDA, K.; KAISE, N.; KAISE, K.; NOMURA, T.; YAMAMOTO, M.; SAITO, S.; TAKASE, S.; YOSHINAGA, K. Thyroid function in patients with myotonic dystrophy. **Clinical Endocrinology**, v. 32, n. 4, p. 485-490, 1990.

GAIAD, T. **Influência da fisioterapia na função motora e histopatologia da fibra muscular esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD)**. 2006. 98 f. Dissertação. (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Texto atlas de histología**. 2. ed. Philadelphia: Copiright, 2002. 444 p.

GATTI, A. **Estudo da função glomerular em Golden Retriever normais, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD)**. 2007. 97 f. Dissertação. (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GEORGE L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. **Histologia comparada**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998. 286 p.

GETTY, R. **Sisson/ Grossman: anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.2, 2000 p.

GOLLINICK, P. D.; IANUZZO, C. D. Hormonal deficiencies and the metabolic adaptations of rats to training. **The American Journal of Physiology**, v.223, n. 2, p. 278-282, 1972.

GOSWAMI, A.; ROSENBERG, I. N. Thyroid hormone modulation of epinephrine- induced lipolysis in rat adipocytes: a possible role of calcium. **Endocrinology**, v. 103, n. 6, p. 2223-2233, 1978.

GRANDO, A. P.; MARIANA, A. N. B.; MIGLINO, M. A.; STERMAN, F. A.; ZATZ, M.; KANAYAMA, L. M.; FEITOSA, M. L. T.; MARTINS, D. S.; MORINI, A. M.; SANTOS, J. P. A.; FADEL, L.; ALVES, F. R.; AMBRÓSIO, C. E. Ultra-sonografia abdominal e pélvica em cães da raça golden retriever sadios, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 123-128, 2009.

GUSTAFSON, R.; TATA, J. R.; LINDBERG, O.; ERNSTER, L. The relationship between the structure and activity of rat skeletal muscle mitochondria after thyroidectomy and thyroid hormone treatment. **The Journal of Cell Biology**, v. 26, n. 2, p. 555-578, 1965.

HAINSEY, T. A.; SENAPATI, S.; KUHN, D. E.; RAFAEL, J. A. Cardiomyopathic features associated with muscular dystrophy are independent of dystrophin absence in cardiovascular. **Neuromuscular Disorders**, n. 13, v. 4, p. 294-302, 2003.

HARPER, P. S. **Myotonic dystrophy**. 2. ed. Londres: WB Saunders, 1989. p. 13-36.

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

HOFFMANN, E. P.; FISCHBECK, K. H.; BROWN, R. H.; JOHNSON, M.; MEDORI, R.; LOIKE, J. D.; HARRIS, J. B.; WATERSTON, R.; BROOKE, M.; SPECHT, L.; KUPSKY, W.; CHAMBERLAIN, J.; CASKEY, T.; SHAPIRO, F.; KUNKEL, L. M. Characterization of dystrophin in muscle- biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. **The New England Journal of Medicine**, v. 318, n. 21, p. 1363-1368, 1988.

HOWEL J. M.; FLETCHER, S.; KAKULAS, B. A.; O'HARA, M.; LOCHMULLER, H.; KARPATI, G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorders**, v. 7, n. 5, p. 325-328, 1997.

HULLAND, J. H. Muscle and tendon. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Ed). **Patology of domestics animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 2003. p. 253-257.

HUNTER, S. The heart in muscular dystrophy. **British Medical Bulletin**, v. 36, p. 133- 134, 1980.

HUTYRA F.; MARECK J.; MANNINGER, R.; MÓCSY, J. **Patología y terapéutica especiales: de los animales domésticos**. 3. ed. Barcelona: Editorial Labor, 1973. p. 695-698, 701-706.

ILINA, N. A. Tireotoksicheseskaja miopatiya. Medizinskie Klinika, v. 39, p. 74-79, 1961.

JOHANSSON, A.; HENRIKSSON, A.; OLOFSSON, B. O.; OLSSON, T. Adrenal steroid dysregulation in dystrophia myotonica. **Journal of Internal Medicine**, v. 245, n. 4, p.345-351, 1999.

JOHANSSON, A.; CARLSTROM, K.; AHREN, B.; CEDERQUIST, K.; KRYLBORG, E.; FORSBERG, H.; OLSSON, T. Abnormal cytokine and adrenocortical hormone regulation in myotonic dystrophy. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 9, p. 3169-3176, 2000.

JOHN, H. A. Plasma thyroxine levels in Duchenne Muscular Dystrophy. **Experientia Basel**, v. 46, n. 3, p. 301- 303, 1990.

JORDE, L. B. **Genética médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 111-113.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Glândulas endócrinas. In:_____ **Histologia básica: texto/ atlas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 390- 414.

KAKULAS, B. A.; MASTAGLIA, F. L. **Pathogenesis and therapy of Duchenne and Becker muscular dystrophies**. New York: Raven Press, 1990. p. 69-82.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 991p.

KING, D. B.; ENRIKIN, R. K. Thyroidal involvement in the expression of avian muscular dystrophy. **Life Sciences**, v. 48, n. 9, p. 909- 916, 1991.

KIRK, R. W.; MULLER, G. H.; SCOTT, D. W. **Dermatologia dos pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1985. 935 p.

KLEIN, I.; LEVEY, G. S. Unusual manifestations of hypothyroidism. **Archives of Internal Medicine**, v. 144, n. 1, p. 123- 128, 1984.

KOPECKY J.; SIGURDSON L.; PARK I. R. A.; HIMMS-HAGEN J. Thyroxine 5'-deiodinase in brown adipose tissue of myopathic hamsters. **The American Journal of Physiology**, v. 251, n. 1 Pt 1, p. 8-13, 1986.

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.

- KOSS, L. G. **Diagnostic cytology:** and its histopathologic bases. 4. ed. Philadelphia USA: J.B. Lippincott company, 1992. v. 2, p. 1268-1279, 1368-1370.
- LARSEN, P. R.; INGBAR, S. H. The thyroid gland. In: WILSON, J., FOSTER D. (Ed). **Williams textbook of endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 1985. p. 682-716.
- LIMA, A. R.; NYENGAARD, J. R.; JORGE, A. A. L.; BALIEIRO, J. C. C.; PEIXOTO, C.; FIORETTO, E. T.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M.; RIBEIRO, A. A. Muscular dystrophy- related quantitative and chemical changes in adenohypophysis GH- cells in Golden Retrievers. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 17, n. 6, p. 480- 491, 2007.
- MARCH, B. E.; BIELY, J.; COATES, V. Thyroxine- binding by muscle mitochondria from normal and genetically dystrophic chickens. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.132, n. 1, p. 345-347, 1969.
- MARQUES, M. J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Brazilian Journal of Morphology and Science**, v.21, n. 3, p. 145-152, 2004.
- MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1504 p.
- MCKERRELL, R. E. Miopatias caninas e felinas. In: DUNN, J.K. **Tratado de Medicina de pequenos animais**. São Paulo: Rocca. 2004. p. 255- 271.
- MIYATAKE, M.; MIIKE, T.; ZHAO, J.; YOSHIOKA, K.; UCHINO, M.; USUKU, G. Possible systemic smooth muscle layer dysfunction due to a deficiency of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 93, n. 1, p. 11-17, 1989.
- MORIUCHI, T.; FUJII, Y.; KAGAWA, N.; HIZAWA, K. Autopsy study on the heart, liver, kidney and brain in Duchenne muscular dystrophy. **The Tokushima Journal of Experimental Medicine**, v. 38, n. 1-2, p. 5-13, 1991.
- MULAREK, J.; GEMBICKI, M. The thyroid function investigation in patients with Muscular Atrophy using radioactive iodine ¹³¹I. **Psychiatria et Neurologia**, v. 152, n. 3, p. 156-161, 1966.
- MUSCATELLI, F.; STROM, T.M.; WALKER, A.P.; ZANARIA E.; RÉCAN, D.; MEINDL, A.; BARDONI, B.; GUIOLI, S.; ZEHETNER, G.; RABL, W. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 672- 676, 1994.
- NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**, v.126, n. 2-3, p. 100–108, 2002.

NOVO, A. C. M. P.; CARVALHO, C. B.; ALVES, R. B. M. Ultrassonografia das glândulas tireóides em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus 1758). **Jornal Brasileiro de Ciencia Animal**, v.2, n. 3, p. 135-149, 2009.

NOWAK, T. V.; IONASESCU, V.; ANURAS, S. Gastrointestinal manifestations of the muscular dystrophies. **Gastroenterology**, v.82, n. 4, p. 800-810, 1982.

NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. **Veterinary diagnostic ultrasound**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p. 142, 145, 168, 178.

OKUMURA, K.; ASO Y.; TAYAMA, K.; YOSHIDA, N.; TAKIGUCHI, Y.; TAKEMURA, Y.; INUKAY, T. Myotonic dystrophy associates with variable circadian rhythms of serum cortisol and isolated thyrotropin deficiency. **The American Journal of the Medical Science**, v. 324, n. 3, p; 158- 160, 2002.

PALMIERI, G. M.; BERTORINI, T. E.; GRIFFIN, J. W.; IGARASHI, M.; KARAS, J. G. Assessment of Wole body composition with dual energy X- ray absorptiometry in Duchenne muscular dystrophy: correlation of lean body mass with muscle function. **Muscle Nerve**, v.19, n. 6, p. 777- 779, 1996.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 97-105, 1995.

PILLERS, D. A.; WELEBER, R. G.; POWELL, B. R.; HANNA, C. E.; MAGENIS, R. E.; BUIST, N. R. Aland Island eye disease (Forsius-Eriksson ocular albinism) and an Xp21 deletion in a patient with Duchenne muscular dystrophy, glycerol kinase deficiency, and congenital adrenal hypoplasia. **American Journal of Medical Genetics**, v. 36, n. 1, p. 23-28, 1990.

REZENDE, J. M. Tireóide or tiróide. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 48, n. 3, p. 432-434, 2004.

RIDEAU, Y. Treatment of Duchenne's myopathy with early physiotherapy. Critical analysis. **Archives Française de pédiatrie**, v.42, n. 1, p. 17–21, 1985.

ROWLAND, L. P. Progressive muscular dystrophies. In:_____ **Merritt's neurology**. 10. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 737-749.

SCAVELLI, T. D.; PETERSON, M. E. Tireóide. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**, 1998. São Paulo: Manole, p. 1799.

SCHEUNERT, A.; TRAUTMANN, A.; KRZYWANIEK, W. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editorial Labor, 1942. p. 294- 305.

SCHLENKER, E. H.; BURBACH, J. A. The dystrophic hamster: na animal modelo f alveolar hypoventilation. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, n. 5, p. 1655- 1662, 1991.

- SCHLENKER, E. H.; BURBACH, J. A. Thyroxine affects ventilation, lung morphometry, and necrosis of diaphragm in dystrophic hamsters. **The American Journal of Physiology**, v. 268, n. 3 Pt 2, p. 779-785, 1995.
- SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, n. 2, p. 127-138, 2005.
- SOUZA, S.; MELO, E. Distrofias musculares. In: WERNECK, L. **Tratamento das doenças neuromusculares**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.534-536.
- SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 6, n. 2, p. 555-560, 2006.
- STEIN, M. T.; TIPNIS, N. A.; SCHULTZ, P. Fatigue, decreased interest in play, motor delay, and elevated liver function test in a 4-year-old boy. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, v. 23, n. 1, p. 37- 41, 2002.
- STEINBECK, K. S.; CARTER, J. N. Thyroid abnormalities in patients with myotonic dystrophy. **Clinical Endocrinology**, v. 17, n. 5, p. 449-456, 1982.
- THOR, G.; TERRYBORRY, J. Muscular dystrophy: Recent Milestones. **Drug and Market Development**, v. 14, p. 115- 123, 2003.
- TKATCHENKO, A. V.; PIÉTU, G.; CROS, N.; GANNOUN-ZAKI, L.; AUFFRAY, C.; LÉGER, J. J.; DECHESNE, C. A. Identification of altered gene expression in skeletal muscle from Duchenne muscular dystrophy patients. **Neuromuscular Disorders**, v. 11, n. 3, p. 269- 277, 2001.
- VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. Review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 543-555, 2003.
- VAINZOF, M.; AYUB-GUERRIERI, D.; ONOFRE, P. C.; MARTINS, P. C.; LOPES, V. F.; ZILBERZTAJN, D.; MAIA, L. S.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, n. 3, p. 241-248, 2008.
- VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; CUMMINGS, J. F.; DELAHUNTA, A. Progressive muscular dystrophy in a Golden Retriever dog: light microscopy and ultrastructural features at 4 and 8 months. **Acta Neuropathologica**, v. 71, n. 3-4, p. 301-310, 1986.
- VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DE LAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 88, n. 1-3, p. 69-81, 1988.

VALENTINE, B. A.; BLUE, J. T.; COOPER, B. J. The effect of exercise on canine dystrophic muscle. **American Neurological Association**, v. 26, n. 4, p. 588, 1989.

VALENTINE, B. A.; BLUE, J. T.; SHELLEY, S. M.; COOPER, B. J. Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, n. 3, p. 140-143, 1990.

VENZKE, W. G. Endocrinologia do carnívoro. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981. 1494-1495.

VIGNOS, P. J.; WAGNER, M. B.; KARLINCHAK, B.; KAIRJI, B. Evaluation of a program for long-term treatment of Duchenne muscular dystrophy. Experience at the University Hospitals of Cleveland. **The journal of bone and joint surgery**, v. 78, n. 12, p. 1844-1852, 1996.

WILLMANN, R.; POSSEKEL, S.; DUBACH-POWEL, J.; MEIER, T.; RUEGG, M. A. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 4, p. 241- 249, 2009.

YIU, E. M.; KORNBERG, A. J. Duchenne muscular dystrophy. Review. **Neurology India**, v. 56, n. 3, p. 236-247, 2008.