

FERNANDA AUCIELLO SALVAGNI

Alterações em adrenais de cães relacionadas à morte súbita ou agônica: análise morfométrica, histopatológica, imunoistoquímica e correlação com os níveis de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal

São Paulo

2015

FERNANDA AUCIELLO SALVAGNI

Alterações em adrenais de cães relacionadas à morte súbita ou agônica:
análise morfométrica, histopatológica, imunoistoquímica e correlação com os níveis de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo
2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3221
FMVZ

Salvagni, Fernanda Auciello

Alterações em adrenais de cães relacionadas à morte súbita ou agônica: análise morfométrica, histopatológica, imunoistoquímica e correlação com os níveis de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal / Fernanda Auciello Salvagni. -- 2015. 90 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Adrenal. 2. Cães. 3. Medicina veterinária legal. 4. Morte súbita. 5. Necropsia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Alterações em adrenais de cães relacionadas à morte súbita ou agônica: análise morfométrica, histopatológica, imunoistoquímica e correlação com os níveis de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal", protocolado sob o nº 2350/2011, utilizando 97 (noventa e sete) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, 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 17/8/2011.

We certify that the Research "Adrenal gland alterations in dogs with sudden or expected death: morphometric, histopathologic and immunohistochemical analysis, and correlation with adrenalin and noradrenalin levels in the adrenal medulla", protocol number 2350/2011, utilizing 97 (ninety seven) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, 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 8/17/2011.

São Paulo, 1º de junho de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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

Fone: + 55 11 3091-7676/0904/8359
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SALVAGNI, Fernanda Auciello

Título: Alterações em adrenais de cães relacionadas à morte súbita ou agônica: análise morfométrica, histopatológica, imunoistoquímica e correlação com os níveis de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha família, por ser o porto seguro ao qual eu sempre posso retornar.

Aos animais, que sempre foram a causa e a razão na escolha e na dedicação à minha profissão.

A todos que lutam por aqueles que não podem se defender.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka, pela orientação, confiança e oportunidades oferecidas, desde a graduação, na área acadêmica e profissional.

Ao Serviço de Patologia Animal, Luciana, residentes e funcionários, pela colaboração na coleta das amostras.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia, Cláudio e Luciano, pela colaboração na confecção das lâminas histológicas.

Ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia pela colaboração com as análises das catecolaminas.

Aos professores do Departamento de Patologia, em especial à Prof. Dra. Cláudia Mori, pela colaboração desde a iniciação científica, e por compartilhar o laboratório para realização das imunoistoquímicas.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa em Medicina Veterinária Legal, Adriana, Anna, Alberto e Elena, pela colaboração, apoio e amizade.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Leonardo, André e Atílio, pela colaboração e discussão de ideias.

Ao laboratório LAB&VET, pelos anos de aprendizado, apoio e incentivo à pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudos, e à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto (processo número 2012/23645-4).

*"A questão não é, 'eles podem pensar?' Ou, 'eles podem falar?'
Mas sim, 'eles podem sofrer?'"*

Jeremy Bentham (1748 - 1832)

RESUMO

SALVAGNI, F.A. **Alterações em adrenais de cães relacionadas à morte súbita ou agônica**: análise morfométrica, histopatológica, imunoistoquímica e correlação com os níveis de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal. [Adrenal gland alterations in dogs with sudden or expected death: morphometric, histopathologic and immunohistochemical analysis, and correlation with adrenaline and noradrenaline levels in the adrenal medulla]. 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

A necropsia é essencial para a identificação da causa de morte e dos processos que culminaram no óbito do animal. O presente estudo visou à pesquisa da real ocorrência de morte súbita e inesperada em cães submetidos à necropsia, e à determinação da discrepância entre as suspeitas dos proprietários em relação ao estado de saúde prévio e à causa de morte de seus cães, quando comparadas às conclusões necroscópicas. Este trabalho também focou nas alterações morfológicas e funcionais nas glândulas adrenais de cães necropsiados, a fim de se estudar a aplicação de possíveis marcadores da resposta adrenal ao estresse sofrido pelo animal na iminência do óbito. Foram utilizados os dados de 82 cães necropsiados na FMVZ-USP para análise da ocorrência real de morte súbita nestes animais. As alterações morfológicas nas adrenais de 46 cães necropsiados foram avaliadas através de análises morfométricas e histopatológicas. Também foram avaliados os índices de proliferação e apoptose nas células do córtex adrenal em relação à causa de morte do animal, através da marcação imunoistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e para BAX e Bcl-2, proteínas envolvidas na regulação da apoptose. A análise das alterações funcionais sofridas pelas adrenais focou na quantificação das concentrações das catecolaminas adrenalina e noradrenalina na medula adrenal dos cães por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (CLAE-DE). Dentre os resultados encontrados, a suspeita do proprietário de que seu cão sofreu uma morte súbita e inesperada é muito maior do que a real ocorrência deste tipo de morte em cães, sendo o óbito por decorrência de complicações de doenças muito mais frequente. As características morfométricas das adrenais dos cães apresentaram maior influência pelo peso corpóreo do animal e pela presença ou ausência de hiperplasia cortical do que pela associação com doenças crônicas ou condições agudas. Cães que vieram

a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas exibiram fibrose em região corticomedular e focos de infiltrado inflamatório, ausentes nos animais com morte súbita ou doenças agudas, além de maior ocorrência de hiperplasia adrenocortical. Cães que sofriam de alterações cardíacas crônicas apresentaram alterações histopatológicas significativas mais marcantes em suas adrenais, como necrose, fibrose e depleção vacuolar cortical. Por outro lado, a congestão severa nas adrenais foi um achado mais frequente nos animais previamente saudáveis que sofreram morte súbita ou que vieram a óbito por doenças agudas. A avaliação dos índices de proliferação celular e apoptose no córtex das adrenais através da marcação imunohistoquímica para PCNA e BAX e Bcl-2, respectivamente, não apresentou potencial relevante para o estudo dos efeitos do estresse por doenças crônicas sobre as adrenais de cães. As concentrações de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal se mostraram muito maiores em cães machos quando comparados às fêmeas. Os achados deste estudo podem auxiliar nas conclusões da necropsia, sendo especialmente relevantes em casos médico-legais, nos quais todos os achados possíveis devem ser relatados e analisados a fim de se prover um diagnóstico preciso, seguro e incontroverso.

Palavras-chave: Adrenal. Cães. Medicina veterinária legal. Morte súbita. Necropsia.

ABSTRACT

SALVAGNI, F.A.. **Adrenal gland alterations in dogs with sudden or expected death**: morphometric, histopathologic and immunohistochemical analysis, and correlation with adrenaline and noradrenaline levels in the adrenal medulla. [Alterações em adrenais de cães relacionadas à morte súbita ou agônica: análise morfométrica, histopatológica, imunoistoquímica e correlação com os níveis de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal]. 2015. 90 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

The necropsy is essential to identify the cause of death and the processes that culminated in the death of the animal. The present study aimed to research the actual occurrence of sudden and unexpected death in dogs subjected to necropsy, and to determine the discrepancy between the suspicions of owners regarding the previous state of health or cause of death of their dogs when compared to the gross findings. This work also focused on the morphological and functional changes in the adrenal glands of dogs submitted to necropsy in order to study the application of possible markers of adrenal stress response experienced by the animal on the verge of death. The data of 82 dogs necropsied in FMVZ-USP was used for analysis of the actual occurrence of sudden death in these animals. The morphological changes in the adrenal glands of 46 necropsied dogs were evaluated by morphometric and histopathological analysis. The proliferation rates and apoptosis in cells of the adrenal cortex regarding the cause of death of the animal were also evaluated by immunohistochemical staining for the nuclear antigen of cellular proliferation (PCNA) and BAX and Bcl-2, proteins involved in apoptosis regulation. The analysis of functional changes in the adrenal gland focused on quantifying the concentrations of the catecholamines adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla of dogs by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-DE). Regarding the results of this study, the owners' suspicion that their dog suffered a sudden and unexpected death is much greater than the actual occurrence of this type of death in dogs, while death due to complications from diseases is far more frequent. The morphometric characteristics of the adrenal glands of dogs showed greater influence by the body weight of the animal and the presence or absence of cortical hyperplasia than by association with chronic or acute conditions. Dogs that died due to chronic disease complications exhibited fibrosis in the corticomedullary

region and foci of inflammatory infiltrate, absent in animals with sudden death or acute diseases, as well as higher incidence of adrenocortical hyperplasia. Dogs suffering from chronic cardiac conditions showed more marked significant histopathological changes in their adrenal glands, such as necrosis, fibrosis and cortical vacuolar depletion. On the other hand, severe congestion in the adrenal glands was a frequent finding in previously healthy animals who suffered sudden death or that died from acute illnesses. The evaluation of cell proliferation rates and apoptosis in the cortex of the adrenal by immunohistochemical staining for PCNA and BAX and Bcl-2, respectively, did not show significant potential for studying the effects of stress by chronic diseases in the adrenal glands of dogs. The adrenaline and noradrenaline concentrations in the adrenal medulla were much higher in male dogs when compared to females. This study's findings may help the necropsy conclusions, which are particularly relevant in forensic cases where all possible findings should be reported and analyzed in order to provide an accurate, confident and uncontroversial diagnosis.

Keywords: Adrenal glands. Dogs. Sudden death. Veterinary forensic sciences. Necropsy.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Necrose e fibrose em adrenais de cães submetidos à necropsia | 43 |
| Figura 2 - Depleção vacuolar cortical em adrenais de cães | 44 |
| Figura 3 - Fotomicrografias de marcação imunoistoquímica nuclear por PCNA em córTEX adrenal de cão | 57 |
| Figura 4 - Fotomicrografias de marcação imunoistoquímica citoplasmática por BAX em córTEX adrenal de cão | 59 |
| Figura 5 - Fotomicrografias de marcação imunoistoquímica citoplasmática por Bcl-2 em córTEX adrenal de cão | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Distribuição dos animais em relação ao sexo, faixa etária e definição de raça nos grupos SUB, DAG e DCR..... | 26 |
| Tabela 2 - Diagnósticos morfológicos principais e causas de morte de 82 cães submetidos à necropsia de rotina no SPA da FMVZ-USP entre 2012 e 2014 | 28 |
| Tabela 3 - Distribuição dos 46 cães submetidos à necropsia no SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014 em relação ao sexo, faixa etária e definição de raça, entre os grupos A e B..... | 38 |
| Tabela 4 - Conclusões das necropsias dos 46 cães submetidos ao SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014 | 39 |
| Tabela 5 - Peso e dimensões de 45 adrenais direitas e 43 adrenais esquerdas de 46 cães submetidos à necropsia no SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014, divididos entre os grupos A e B..... | 40 |
| Tabela 6 - Peso e dimensões das adrenais com presença ou ausência de hiperplasia cortical de 46 cães submetidos à necropsia no SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014 | 41 |
| Tabela 7 - Achados histopatológicos nas glândulas adrenais de 46 cães submetidos à necropsia no SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014, divididos entre os grupos A e B..... | 42 |
| Tabela 8 - Relação dos cães recebidos pelo Serviço de Patologia Animal - FMVZ-USP utilizados para coleta das adrenais, referente às causas de morte e diagnósticos morfológicos principais | 56 |
| Tabela 9 - Porcentagem de marcação imunoistoquímica nuclear para PCNA em córtex adrenal de cães submetidos à necropsia em relação aos grupos A e B, sexo e idade | 58 |
| Tabela 10 - Distribuição dos 46 cães de acordo com a causa de morte concluída pela necropsia..... | 69 |
| Tabela 11 - Concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com o sexo e a faixa etária dos animais | 70 |
| Tabela 12 - Concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com a causa de morte dos animais..... | 71 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1 -Períodos de sobrevivência supostos pelo proprietário e concluídos pela necropsia dos 82 cães submetidos a necropsias de rotina no SPA da FMVZ-USP entre 2012 e 2014 | 25 |
| Gráfico 2 -Incidência de animais com doenças agudas e crônicas diagnosticadas pela necropsia dos 67 cães que vieram a óbito por complicações de doenças..... | 25 |
| Gráfico 3 -Médias de idade dos grupos SUB, DAG e DCR..... | 27 |
| Gráfico 4 -Médias de idade dos grupos A e B..... | 38 |
| Gráfico 5 -Médias de peso corpóreo dos grupos A e B..... | 39 |
| Gráfico 6 -Mediana dos escores de marcação para BAX e Bcl-2 em relação à análise semi-quantitativa entre os grupos A e B, entre os sexos e entre as diferentes faixas etárias..... | 61 |
| Gráfico 7 -Médias de concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com o sexo dos animais..... | 70 |
| Gráfico 8 -Médias de concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com a faixa etária dos animais | 71 |
| Gráfico 9 -Médias de concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com a causa de morte dos animais | 72 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL..... | 18 |
| 2 | MORTE SÚBITA EM CÃES COM DOENÇAS CRÔNICAS: INCIDÊNCIA E DISCREPÂNCIAS ENTRE AS SUSPEITAS DOS PROPRIETÁRIOS E OS ACHADOS DE NECROPSIA | 21 |
| 2.1. | INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2.2. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 23 |
| 2.2.1. | Animais..... | 23 |
| 2.2.2. | Análises estatísticas | 24 |
| 2.3. | RESULTADOS | 24 |
| 2.4. | DISCUSSÃO | 28 |
| 2.5. | CONCLUSÃO | 32 |
| 3 | ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM ADRENAIS DE CÃES QUE VIERAM A ÓBITO EM DECORRÊNCIA DE DOENÇAS CRÔNICAS..... | 33 |
| 3.1. | INTRODUÇÃO..... | 33 |
| 3.2. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 35 |
| 3.2.1. | Animais..... | 35 |
| 3.2.2. | Coleta de amostras e mensuração..... | 36 |
| 3.2.3. | Análises histopatológicas | 36 |
| 3.2.4. | Análises estatísticas | 36 |
| 3.3. | RESULTADOS | 37 |
| 3.3.1. | Animais..... | 37 |
| 3.3.2. | Análises morfométricas | 40 |
| 3.3.3. | Análises histopatológicas | 41 |
| 3.4. | DISCUSSÃO | 45 |
| 3.5. | CONCLUSÃO | 49 |
| 4 | EFEITOS DO ESTRESSE CAUSADO POR DOENÇAS CRÔNICAS NA PROLIFERAÇÃO E NA APOPTOSE DE CÉLULAS DO CÓRTEX ADRENAL DE CÃES: ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE PCNA, BAX E BCL-2..... | 51 |
| 4.1. | INTRODUÇÃO..... | 51 |
| 4.2. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 53 |
| 4.2.1. | Animais e amostras..... | 53 |

| | | |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.2. | Marcações imunoistoquímicas | 53 |
| 4.2.3. | Avaliações imunoistoquímicas | 54 |
| 4.2.4. | Análises estatísticas | 55 |
| 4.3. | RESULTADOS | 55 |
| 4.4. | DISCUSSÃO | 62 |
| 4.5. | CONCLUSÃO | 63 |
| 5 | QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ADRENALINA E NORADRENALINA NA MEDULA ADRENAL DE CÃES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA (CLAE-DE): RELAÇÃO COM O SEXO, IDADE E CAUSA DE MORTE DOS ANIMAIS | 64 |
| 5.1. | INTRODUÇÃO..... | 64 |
| 5.2. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 66 |
| 5.2.1. | Animais..... | 66 |
| 5.2.2. | Amostras | 67 |
| 5.2.3. | Quantificação de adrenalina e noradrenalina em medula adrenal por CLAE-DE..... | 67 |
| 5.2.4. | Análises estatísticas | 68 |
| 5.3. | RESULTADOS | 69 |
| 5.4. | DISCUSSÃO | 72 |
| 5.5. | CONCLUSÃO | 76 |
| 6 | CONCLUSÃO GERAL | 77 |
| | REFERÊNCIAS..... | 80 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A medicina veterinária legal é uma área da profissão que se encontra em franca expansão e alta demanda, em virtude do aumento da conscientização de médicos veterinários, juízes, advogados, polícia e proprietários de animais em relação à gravidade dos crimes de abuso, maus-tratos, erro médico ou negligência contra animais e suas devidas consequências legais (COOPER; COOPER, 1998, 2008; MUNRO, 1998; MUNRO; MUNRO, 2008, 2013; BALKIN; JANSSEN; MERCK, 2012; SALVAGNI et al., 2012, 2014; DE SIQUEIRA et al., 2012, 2015; GERDIN; MCDONOUGH, 2013; MCDONOUGH et al., 2014).

No Brasil, tais ocorrências são classificadas como crimes contra o meio ambiente, de acordo com a Lei Federal número 9605 de 12 de fevereiro de 1998, em seu artigo número 32, que identifica como crime as práticas de abuso, maus-tratos, ferimento ou mutilação de animais silvestres e domésticos. A pena para tais crimes prevê detenção de três meses a um ano e cobrança de multa; caso ocorra a morte do animal em consequência a tais práticas, a pena é aumentada de um sexto a um terço.

O aumento da demanda pela medicina veterinária legal se reflete na crescente necessidade de profissionais qualificados, versados nas mais diversas áreas da medicina veterinária (COOPER; COOPER, 1998, 2008; BALKIN; JANSSEN; MERCK, 2012; MARLET; MAIORKA, 2012). Em casos com potencial jurídico em que haja a morte do animal, a realização da necropsia é fundamental, e o patologista veterinário é o profissional mais indicado para a realização de um exame pós-morte minucioso, organizado e preciso (SALVAGNI et al., 2012; MUNRO; MUNRO, 2013; MCDONOUGH et al., 2014). Estes profissionais possuem grande experiência com as técnicas utilizadas para a realização de uma necropsia completa e eficiente, além de distinguirem com precisão as lesões verdadeiras das alterações pós-morte, propiciando uma correlação consistente entre os achados do exame e a causa de morte do animal (MUNRO, 1998; COOPER; COOPER, 2008; SALVAGNI et al., 2012, 2014).

As informações fornecidas pelo exame necroscópico podem ser enriquecidas por uma série de análises complementares, que auxiliem na identificação da real causa de morte e dos processos envolvidos que culminaram no óbito do animal, a

fim de se prover um diagnóstico seguro e que não propicie margem a dúvidas (MARLET, 2010; GERDIN; MCDONOUGH, 2013; MUNRO; MUNRO, 2013; SALVAGNI et al., 2014).

Os animais podem vir a óbito de forma rápida e inesperada, sendo aparentemente saudáveis, em casos de síndrome da dilatação e vólvulo gástricos, choque anafilático, intoxicação exógena ou traumas severos, dentre outros (OLSEN; ALLEN, 2000; PARRY, 2008a). Este tipo de morte, que ocorre em minutos a poucas horas após o surgimento de sua causa básica, é chamado de morte súbita, enquanto a morte por decorrência de doenças agudas ou crônicas, chamada morte agônica, pode ocorrer dias ou semanas após a eclosão do processo que culminou no óbito, como nos casos de infecção, neoplasias ou doenças degenerativas (SÄRKIOJA; HIRVONEN, 1984; DIMAIO; DIMAIO, 2001; VANRELL, 2007; FRANÇA, 2008). É esperado que as mortes súbitas em animais de companhia, previamente identificados como saudáveis por seus proprietários, apresentem maior procura pela medicina veterinária legal; porém, não é incomum que a necropsia de cães e gatos com suspeita de morte súbita apresente achados de doenças agudas ou crônicas (OLSEN; ALLEN, 2000, 2001; PARRY, 2008a).

Em necropsias médico-legais veterinárias, a ocorrência de achados de doenças crônicas em animais cujo proprietário acreditava ser previamente saudável pode levar a dúvidas ou disputa durante o processo jurídico, e o profissional veterinário responsável pelo exame pode ser convocado em juízo a prestar esclarecimentos relacionados ao relatório produzido (SINCLAIR; MERCK; LOCKWOOD, 2006; MARLET, 2010). Desta forma, é essencial que este profissional seja capaz de fornecer provas que corroborem as conclusões fornecidas (MARLET, 2010; SALVAGNI et al., 2014).

Neste contexto, o presente estudo visou à pesquisa da real ocorrência de morte súbita e inesperada em cães submetidos à necropsia em um serviço de patologia animal, e à determinação da discrepância entre as suspeitas dos proprietários em relação ao estado de saúde prévio e à causa de morte de seus cães, quando comparadas às conclusões necroscópicas. Ademais, este trabalho promoveu o enfoque nas alterações morfológicas e funcionais nas glândulas adrenais de cães submetidos à necropsia, em relação às condições de injúria agudas ou crônicas que culminaram no óbito do animal, a fim de se estudar a

aplicação de possíveis marcadores da resposta adrenal ao estresse sofrido pelo animal na iminência do óbito.

As alterações morfológicas nas glândulas adrenais dos cães foram avaliadas através da análise morfométrica, em relação ao peso e às dimensões das adrenais, e também do exame histopatológico das glândulas, pesquisando lesões agudas e crônicas. Também foram avaliados os índices de proliferação e apoptose nas células do córtex adrenal em relação às condições agudas e crônicas sofridas pelo animal, através da marcação imunoistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e para BAX e Bcl-2, proteínas envolvidas na regulação da apoptose.

A análise das alterações funcionais sofridas pelas adrenais focou na quantificação das concentrações das catecolaminas adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de cães através da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (CLAE-DE), e sua relação com o sexo, a faixa etária e as causas de morte dos animais.

2 MORTE SÚBITA EM CÃES COM DOENÇAS CRÔNICAS: INCIDÊNCIA E DISCREPÂNCIAS ENTRE AS SUSPEITAS DOS PROPRIETÁRIOS E OS ACHADOS DE NECROPSIA

2.1. INTRODUÇÃO

Entende-se como morte súbita aquela que ocorre de maneira rápida e inesperada, em questão de minutos a poucas horas, em um indivíduo aparentemente saudável, sem diagnóstico ou reconhecimento prévio de uma condição patológica. Por outro lado, a morte agônica ocorre dias ou semanas após o surgimento de sua causa básica (SÄRKIOJA; HIRVONEN, 1984; DIMAIO; DIMAIO, 2001; VANRELL, 2007; FRANÇA, 2008). O período transcorrido entre a eclosão do processo desencadeante e a morte propriamente dita é conhecido como período de sobrevivência (FRANÇA, 2008).

A morte súbita em cães pode ocorrer como consequência da síndrome da dilatação e vólvulo gástricos, do choque anafilático, da intoxicação exógena ou de traumas severos, dentre outros (OLSEN; ALLEN, 2000; PARRY, 2008a). Por outro lado, as doenças infecciosas, neoplásicas ou degenerativas são causas comuns de morte agônica (VANRELL, 2007; FRANÇA, 2008). Não é incomum encontrar, porém, achados necroscópicos referentes a doenças crônicas em cães com suspeita de morte súbita por seus proprietários (OLSEN; ALLEN, 2000; PARRY, 2008a).

Essa discrepância entre a causa de morte ou o estado de saúde do animal prévio ao óbito supostos pelo proprietário e sugeridos pela necropsia pode gerar dúvidas ou até mesmo disputa, principalmente em um contexto jurídico. Atos de abuso e maus-tratos contra animais são considerados crimes contra o meio ambiente, de acordo com o artigo 32 da Lei Federal nº 9605 de crimes ambientais de 1998. Casos de óbito de animais com suspeita de crueldade, erro médico, imperícia ou negligência, dentre outros, são passíveis de culminar em um processo jurídico, tendo como uma de suas principais bases de prova o relatório de necropsia do animal (MUNRO, 1998; MARLET, 2010; DE SIQUEIRA et al., 2012, 2015; MARLET; MAIORKA, 2012; MERCK; MILLER; MAIORKA, 2012; SALVAGNI et al., 2014).

A necropsia é um dos principais instrumentos da patologia forense, sendo essencial não só para a determinação da causa de morte, mas também para a pesquisa das lesões associadas e seu envolvimento com a morte, além da sugestão do estado de saúde geral anterior ao óbito do animal (MUNRO; MUNRO, 2008; JENSEN, 2011; MARLET; MAIORKA, 2012; GERDIN; MCDONOUGH, 2013; SALVAGNI et al., 2014). Recomenda-se que a necropsia com finalidade forense seja documentada, para a devida preservação dos achados no momento do exame e posterior apreciação pelos envolvidos no caso, como juízes e advogados (MUNRO, 1998; MARLET; MAIORKA, 2012; GERDIN; MCDONOUGH, 2013; SALVAGNI et al., 2014). Também é fortemente recomendado que as necropsias de animais sejam executadas por um médico veterinário patologista (MUNRO, 1998; SALVAGNI et al., 2012, 2014; GERDIN; MCDONOUGH, 2013). Os patologistas veterinários têm grande experiência com as técnicas utilizadas para a realização de uma necropsia completa e eficiente, além de serem capazes de distinguir com precisão as lesões ocorridas em vida das alterações que ocorrem após a morte, propiciando uma correlação consistente entre os achados do exame e a causa de morte do animal (MUNRO, 1998; COOPER; COOPER, 2008; SALVAGNI et al., 2012, 2014). No contexto da crescente expansão da área de medicina veterinária legal, profissionais qualificados com conhecimento em patologia forense estão em alta demanda (COOPER; COOPER, 1998, 2008; MUNRO, 1998; MUNRO; MUNRO, 2008, 2013; BYARD; BOARDMAN, 2011; MARLET; MAIORKA, 2012; MCDONOUGH et al., 2014).

As conclusões da necropsia devem ser fidedignas aos achados do exame e incluir todas as alterações encontradas, independente de sua relação com a causa da morte, a fim de se preservar a veracidade e a precisão dos fatos descritos (MARLET, 2010; SALVAGNI et al., 2014). Desta forma, as conclusões da necropsia estarão amparadas pela observação dos fatos e corroboradas pelo registro fotográfico nas necropsias documentadas, a fim de se reduzir a ocorrência de dúvidas ou disputa no contexto jurídico (MUNRO; MUNRO, 2013).

O objetivo deste trabalho é reunir os diagnósticos morfológicos principais e as causas de morte de cães submetidos a necropsias de rotina em um serviço de patologia animal, a fim de se avaliar a real incidência de morte súbita em cães e as discrepâncias entre o período de sobrevivência suposto pelo proprietário e o sugerido pela necropsia.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Animais

Foram coletadas informações referentes à raça, idade, sexo, histórico, suspeitas do proprietário acerca da morte do animal, diagnóstico morfológico principal e causa de morte de 82 cães submetidos à necropsia no Serviço de Patologia Animal (SPA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) entre 2012 e 2014. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP (protocolo número 2350/2011).

Os diagnósticos morfológicos principais foram agrupados de acordo com o sistema ou região corporal envolvidos na lesão principal que culminou no óbito do animal. Apesar de alguns animais apresentarem condições patológicas concomitantes, apenas as lesões principais foram consideradas para a avaliação da casuística de diagnósticos morfológicos principais, à semelhança dos métodos adotados na literatura (BONNETT et al., 1997, 2005; MOORE et al., 2001; FIGHERA et al., 2008).

Para fins de comparação, os animais foram divididos em faixas etárias, descritas a seguir: menor ou igual a 1 ano (filhotes), maior que 1 ano e menor ou igual a 3 anos (adultos jovens), maior que 3 anos e menor ou igual a 6 anos (adultos), maior que 6 anos e menor ou igual a 9 anos (adultos mais velhos), acima de 9 anos (idosos). Em relação à raça, os cães foram classificados em animais com raça definida (CRD) e sem raça definida (SRD), de acordo com a declaração do proprietário e com a observação no cadáver das características padrão das raças conhecidas de cães.

Após a determinação das conclusões da necropsia, os animais foram divididos em três grupos. Os cães que eram previamente saudáveis ao óbito e que sofreram morte súbita foram alocados ao grupo SUB. Já os animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças agudas ou crônicas, previamente reconhecidas ou desconhecidas pelo proprietário, foram divididos entre o grupo DAG, com doenças agudas, e o grupo DCR, com doenças crônicas.

As informações coletadas referentes aos cães amostrados foram organizadas em tabelas para a formação de uma base de dados no software Microsoft Excel® (Redmond, Washington, EUA).

2.2.2. Análises estatísticas

As comparações entre os grupos SUB, DAG e DCR foram realizadas através do teste de qui-quadrado, referente ao sexo e à raça dos animais, e ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey de comparações múltiplas, em relação à idade. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparação entre o período de sobrevivência suposto pelos proprietários e sugerido pelas necropsias dos 82 animais.

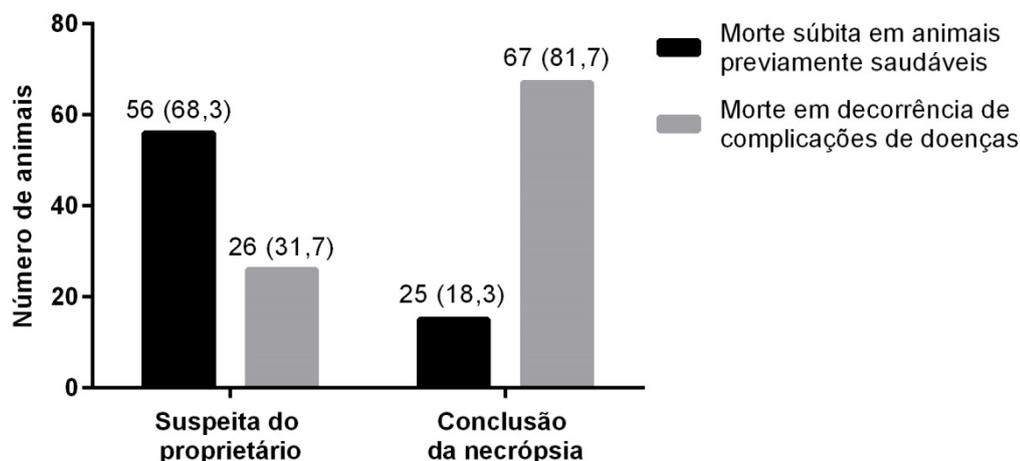
Todas as análises estatísticas foram realizadas no software analítico GraphPad Prism® versão 6 (San Diego, Califórnia, EUA), e apenas valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

2.3. RESULTADOS

Os períodos de sobrevivência supostos pelo proprietário e concluídos pela necropsia estão representados no gráfico 1. Houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre as suspeitas dos proprietários e as conclusões das necropsias em relação ao período de sobrevivência dos animais amostrados.

A incidência de doenças agudas e doenças crônicas diagnosticadas pela necropsia, dentre os 67 animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças conforme demonstrado pelo gráfico 1, está representada no gráfico 2.

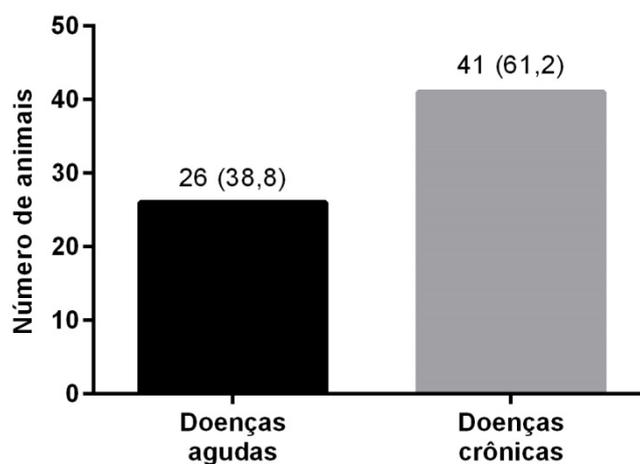
Gráfico 1 - Períodos de sobrevivência supostos pelo proprietário e concluídos pela necropsia dos 82 cães submetidos a necropsias de rotina no SPA da FMVZ-USP entre 2012 e 2014



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: As barras representam o número absoluto de animais seguido pela porcentagem entre parênteses. Teste exato de Fisher, com valor de $p < 0,0001$.

Gráfico 2 - Incidência de animais com doenças agudas e crônicas diagnosticadas pela necropsia dos 67 cães que vieram a óbito por complicações de doenças



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: As barras representam o número absoluto de animais seguido pela porcentagem entre parênteses.

Com base nas conclusões das necropsias, os cães foram divididos nos três grupos previamente descritos, sendo o grupo SUB composto por 15 cães e os grupos DAG e DCR compostos por 26 e 41 cães, respectivamente.

As informações referentes ao sexo, faixa etária e raça dos animais amostrados em cada grupo encontram-se sumarizadas na tabela 1.

Não houve diferença significativa em relação ao sexo e à definição de raça entre os três grupos; as médias de idade, porém, apresentaram diferenças significativas entre os grupos, conforme representado no gráfico 3.

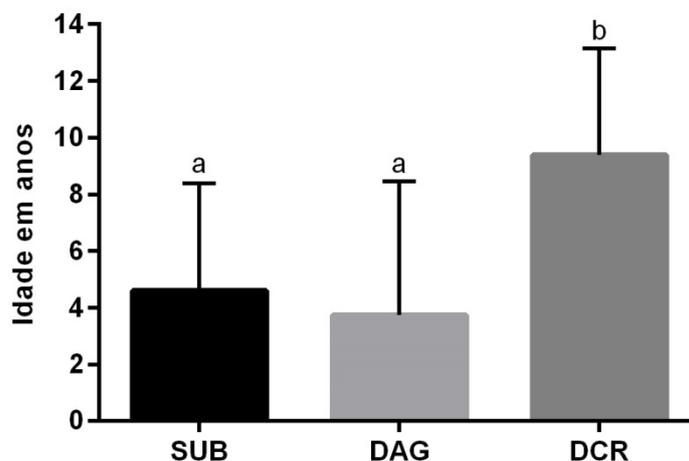
Tabela 1 - Distribuição dos animais em relação ao sexo, faixa etária e definição de raça nos grupos SUB, DAG e DCR

| Parâmetros | SUB (n = 15) | DAG (n = 26) | DCR (n = 41) | Total (n = 82) |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Sexo[†] | | | | |
| Macho | 10 (66,7) | 15 (57,7) | 19 (46,3) | 44 (53,7) |
| Fêmea | 5 (33,3) | 11 (42,3) | 22 (53,7) | 38 (46,3) |
| Faixa etária | | | | |
| ≤ 1 ano | 3 (20,0) | 16 (61,5) | 0 (0) | 18 (22,0) |
| > 1 ano e ≤ 3 anos | 4 (26,7) | 0 (0) | 4 (9,8) | 9 (11,0) |
| > 3 anos e ≤ 6 anos | 3 (20,0) | 1 (3,8) | 6 (14,6) | 10 (12,2) |
| > 6 anos e ≤ 9 anos | 3 (20,0) | 5 (19,2) | 7 (17,1) | 15 (18,3) |
| > 9 anos | 2 (13,3) | 4 (15,4) | 24 (58,5) | 30 (36,6) |
| Raça[†] | | | | |
| Com raça definida (CRD) | 9 (60,0) | 19 (73,1) | 33 (80,5) | 61 (74,4) |
| Sem raça definida (SRD) | 6 (40,0) | 7 (26,9) | 8 (19,5) | 21 (25,6) |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: o grupo SUB é composto por animais previamente saudáveis ao óbito, com morte súbita, enquanto os grupos DAG e DCR são compostos por animais que vieram a óbito em decorrência de doenças agudas e doenças crônicas, respectivamente. O número de animais é representado pelo número absoluto seguido pela porcentagem entre parênteses. [†] Teste de qui-quadrado para comparações referentes ao sexo ($p=0,3546$) e à definição de raça ($p=0,2932$) entre os três grupos.

Gráfico 3 - Médias de idade dos grupos SUB, DAG e DCR



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: As barras representam as médias de idade com os desvios padrão. Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey de comparações múltiplas, com valor de $p < 0,0001$. Letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$). O grupo SUB é composto por 15 animais previamente saudáveis ao óbito, com morte súbita, enquanto os grupos DAG e DCR são compostos por animais que vieram a óbito em decorrência de doenças agudas ($n=26$) e doenças crônicas ($n=41$), respectivamente.

As causas de morte e o diagnóstico morfológico principal dos animais amostrados encontram-se descritos na tabela 2.

Os diagnósticos morfológicos principais foram agrupados a partir das conclusões fornecidas pela necropsia dos animais amostrados. Por exemplo, cães que apresentaram, como lesão principal, gastrite, enterite ou colite, foram agrupados no diagnóstico morfológico principal de “alterações gastrointestinais”, enquanto animais com pneumonia ou asfixia foram alocados ao grupo “alterações respiratórias”.

As lesões neoplásicas, quando presentes, foram agrupadas de acordo com o tecido ou órgão principal afetado; por exemplo, neoplasias uretrais ou uterinas foram contidas no grupo “alterações urogenitais”, enquanto neoplasias cardíacas foram alocadas nas “alterações cardiovasculares”. No caso das neoplasias metastáticas presentes em mais de um órgão, estas compõem o grupo “neoplasias metastáticas disseminadas”.

Tabela 2 - Diagnósticos morfológicos principais e causas de morte de 82 cães submetidos à necropsia de rotina no SPA da FMVZ-USP entre 2012 e 2014

| Conclusões das necropsias | Número de animais |
|------------------------------------------------------|-------------------|
| Diagnóstico morfológico principal[†] | |
| Alterações cardiovasculares | 25 (30,5) |
| Alterações gastrointestinais | 19 (23,2) |
| Alterações respiratórias | 17 (20,7) |
| Peritonites | 6 (7,3) |
| Hemorragias agudas severas | 5 (6,1) |
| Alterações urogenitais | 5 (6,1) |
| Alterações do sistema nervoso central | 3 (3,7) |
| Neoplasias metastáticas disseminadas | 1 (1,2) |
| Alterações hepáticas | 1 (1,2) |
| Causa de morte | |
| Colapso cardiorrespiratório | 25 (30,5) |
| Colapso respiratório | 17 (20,7) |
| Choque séptico | 17 (20,7) |
| Choque hipovolêmico | 11 (13,4) |
| Choque anafilático | 4 (4,9) |
| Choque cardiogênico | 3 (3,7) |
| Choque neurogênico | 3 (3,7) |
| Intoxicação exógena | 2 (2,4) |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: [†] Os diagnósticos morfológicos principais foram agrupados de acordo com o sistema ou região corporal envolvidos na lesão principal. O número de animais é representado pelo número absoluto seguido pela porcentagem entre parênteses.

2.4. DISCUSSÃO

Os achados deste estudo permitiram a verificação e a confirmação da discrepância entre os períodos de sobrevivência supostos pelo proprietário e concluídos pela necropsia em um serviço de patologia animal.

A principal suspeita dos proprietários dos 82 cães submetidos à necropsia no SPA da FMVZ-USP entre 2012 e 2014 era de morte súbita em animais previamente saudáveis (56/82; 68,3%), enquanto a necropsia concluiu que 81,7% (67/82) dos cães morreram em decorrência de complicações de doenças. Dentre estes animais com doenças (n=67), 61,2% (41/67) apresentavam enfermidades crônicas. Estes dados são compatíveis com os achados de Olsen e Allen (2000), em um estudo retrospectivo realizado com 151 cães no Canadá, no qual achados de doenças crônicas estavam frequentemente presentes em cães com suspeita de morte súbita, enfatizando que a verdadeira morte súbita em animais previamente saudáveis é relativamente rara em cães (PARRY, 2008b).

A alta ocorrência da suspeita de morte súbita pelos proprietários pode estar relacionada ao fato de que os sinais de determinadas doenças crônicas podem não ser detectados ou reconhecidos pelos proprietários, como na insuficiência cardíaca crônica. A fase de compensação desta condição pode apresentar progressão clínica silenciosa, sendo diagnosticada apenas na fase terminal da falência cardíaca (WARE, 2007). Sendo a doença desconhecida pelo proprietário, este pode expor seu animal a situações estressantes inadvertidamente, como no caso de exercícios intensos em altas temperaturas ou da participação em campanhas públicas de vacinação, as quais são repletas por animais e pessoas estranhas ao cão e que geralmente não realizam avaliações clínicas prévias à vacinação. As situações estressantes podem descompensar o sistema cardiovascular e levar ao óbito (LEGAULT et al., 1990; DIMAIO; DIMAIO, 2001; WARE, 2007), gerando a suspeita de morte súbita.

Apesar das doenças arteriais coronárias serem consideradas como a causa principal de morte súbita em humanos (SÄRKIOJA; HIRVONEN, 1984; DIMAIO; DIMAIO, 2001), tal condição é rara em cães, sendo as cardiomiopatias dilatadas ou hipertróficas muito mais comuns (WARE, 2007; MEURS, 2010). Neste estudo, 23% (13/56) dos casos com suspeita de morte súbita ocorreram em cães com disfunções cardíacas crônicas, à semelhança do encontrado no estudo de Olsen e Allen (2000).

A alta ocorrência de doenças crônicas em cães supostos como previamente saudáveis por seus proprietários reforça a importância da realização de exames clínicos preventivos e periódicos nos animais, não só para o diagnóstico e tratamento de possíveis condições patológicas, como também para evitar a exposição de animais doentes a situações que possam levar a descompensações sistêmicas e, conseqüentemente, ao óbito.

Adicionalmente, 20% (11/56) dos casos de suspeita de morte súbita neste estudo envolviam filhotes que vieram a óbito em decorrência de doenças infecciosas, como cinomose ou parvovirose. Apesar de filhotes de cães com anticorpos maternos ou vacinais insuficientes serem menos resistentes a doenças infecciosas, a morte geralmente ocorre após mais de 24 horas depois do surgimento de sinais como hipofagia ou anorexia, febre, diarreia, êmese ou descargas oculares purulentas, sendo o óbito decorrente da perda de líquidos ou de infecções bacterianas secundárias (GREENE; APPEL, 2006; MCCAWE; HOSKINS, 2006). Em

alguns casos, tais sinais podem não constatados pelo proprietário se o animal não for observado com atenção.

A discrepância entre a causa de morte suposta pelo proprietário e os achados necroscópicos é especialmente importante em casos com potencial jurídico, como exemplificado por dois casos contidos neste estudo. Em um dos casos, havia a suspeita de que o óbito do cão fora em decorrência de reação anafilática à vacina de raiva, quando, de fato, o animal havia sofrido intoxicação por carbamato, um praguicida anticolinesterásico comumente utilizado em intoxicações exógenas intencionais de animais (XAVIER; SPINOSA, 2008; DE SIQUEIRA et al., 2015). O outro cão apresentara convulsões e seu proprietário suspeitara de intoxicação exógena; porém, a necropsia revelou choque séptico devido a uma prostatite supurativa grave não diagnosticada em vida. Tais discrepâncias reforçam a importância da realização da necropsia, mesmo que a suspeita não seja de morte violenta (SALVAGNI et al., 2014). Em casos de suspeita de intoxicação exógena, particularmente, é comum que o proprietário encaminhe seu animal à necropsia em um SPA já munido de um boletim de ocorrência e, não raro, com a nomeação de possíveis suspeitos, podendo resultar em uma investigação criminal (DE SIQUEIRA et al., 2015). Em tais casos, a necropsia documentada é imprescindível, mesmo que o resultado não seja compatível com a suspeita de intoxicação exógena. A documentação da necropsia e de todos os seus achados é essencial para auxiliar, no contexto jurídico, na comprovação de que houve ou não uma ação criminal envolvida na morte do animal (SALVAGNI et al., 2014; DE SIQUEIRA et al., 2015).

As causas de morte dos cães deste estudo são compatíveis com os achados de Michell (1999), em um estudo referente à causa de morte de mais de três mil cães no Reino Unido, o qual identificou que 64% destes animais vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças. Os diagnósticos morfológicos principais encontrados no presente trabalho também são similares aos achados de Olsen e Allen (2000), nos quais as doenças cardiovasculares, respiratórias e gastrointestinais estiveram entre as ocorrências mais altas. Por outro lado, há estudos com mortalidade de cães que identificaram as doenças ósseas ou articulares e neoplasias dentre as principais lesões que causaram a morte de cães (BONNETT et al., 1997, 2005; MICHELL, 1999; MOORE et al., 2001). Neste estudo, porém, não foram observadas doenças ósseas ou articulares como lesões principais responsáveis pelo óbito dos animais. Contudo, o estudo de Moore et al. (2001), foi

realizado com cães militares das raças Pastor Alemão e Pastor Belga, as quais apresentam alta predisposição a doenças ósseas e articulares (SMITH et al., 2001; BOCKSTAHLER et al., 2007). Em relação à ocorrência de neoplasias, apenas seis (7,3%) dos 82 animais do presente estudo apresentaram lesões neoplásicas, com origens e localizações diversas. Apesar de este estudo apresentar alta ocorrência de animais idosos e as lesões neoplásicas serem mais comuns nestes animais (MEUTEN, 2002), a baixa ocorrência de neoplasias pode ser explicada pelo fato de que animais com diagnóstico de neoplasia são, muitas vezes, encaminhados para eutanásia, como observado nos estudos de Bonnet e colaboradores (1997, 2005). Animais eutanasiados não foram amostrados neste estudo, uma vez que o objetivo deste era avaliar a discrepância entre a suspeita da causa de morte do animal por seu proprietário e a conclusão da necropsia, discrepância esta que não é comum em casos de eutanásia, uma vez que a decisão do proprietário, nestes casos, é baseada no diagnóstico prévio da condição clínica terminal do animal.

Não houve diferença significativa entre os três grupos em relação ao sexo e à raça dos animais. A média de idade, porém, era maior no grupo DCR ($9,4 \pm 3,7$) em relação aos grupos SUB ($4,6 \pm 3,8$) e DAG ($3,7 \pm 4,7$). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que o grupo DCR era composto por animais com doenças crônicas, as quais são mais comumente observadas em animais mais velhos (MICHELL, 1999; GREENE, 2006; MAXIE, 2007; WARE, 2007). Os animais com morte súbita ou doenças agudas apresentaram menor média de idade e, no caso da morte súbita, este achado foi similar ao estudo de Siqueira e colaboradores (2012), no qual os gatos jovens apresentaram maior risco de morte súbita por intoxicação ou por trauma não acidental. No caso dos animais do grupo DAG, estes eram formados principalmente por animais filhotes (61,5%; 16/26), os quais, conforme mencionado previamente, são mais suscetíveis a doenças infecciosas agudas (GREENE; APPEL, 2006; MCCAWE; HOSKINS, 2006).

2.5. CONCLUSÃO

A marcante discrepância entre o período de sobrevivência suposto pelo proprietário e o sugerido pela necropsia é caracterizada pela alta ocorrência de achados necroscópicos de doenças agudas ou crônicas em cães com suspeita de serem previamente saudáveis.

Tais achados reforçam a importância da necropsia, especialmente em casos com potencial jurídico, e da relevância dos exames preventivos periódicos em animais de companhia, para que haja o diagnóstico precoce de doenças e a pronta instalação de tratamentos adequados, além da prevenção da exposição de animais doentes a situações conhecidamente estressantes, que possam gerar descompensações sistêmicas e culminar no óbito.

3 ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM ADRENAIS DE CÃES QUE VIERAM A ÓBITO EM DECORRÊNCIA DE DOENÇAS CRÔNICAS

3.1. INTRODUÇÃO

O estresse é definido como uma reação do organismo frente a agentes agressores de diversas naturezas, na tentativa de preservar e manter a homeostasia (SELYE, 1956). Os primeiros estudos aprofundados sobre estresse foram realizados pelo pesquisador endocrinologista Hans Selye em 1936, no Canadá, que denominou os agentes causadores de estresse como “estressores”, os quais podem ter origens físicas, químicas ou psicológicas (SELYE, 1936). Duas décadas depois, seu estudo com ratos e a resposta do organismo frente a agentes estressores estabeleceu a hipótese da “síndrome geral de adaptação”, uma resposta adaptativa inespecífica e estereotipada que incluiria, dentre outras alterações orgânicas, variações na morfologia e na função das glândulas adrenais (SELYE, 1956).

As adrenais são órgãos bilaterais localizados na região suprarrenal, recobertos por cápsula de tecido conjuntivo denso e compostas por duas regiões anatômicas distintas: o córtex e a medula adrenal (BANKS, 1991; DYCE; SACK; WENSING, 2004; GUYTON; HALL, 2006). O córtex, derivado da mesoderma da crista neural, é subdividido em zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticulada. A zona glomerulosa encontra-se na região subcapsular, sendo formada por células colunares ou poliédricas organizadas em cordões curvados ou arcos. A zona fasciculada, a mais extensa do córtex adrenal, é formada por células poliédricas com citoplasma abundante e intensamente vacuolizado, arranjas em cordões radiais banhados por extensa trama de seios venosos. As células da zona reticulada são bastante semelhantes às da zona fasciculada, porém, costumam apresentar menor quantidade de vacúolos lipídicos citoplasmáticos. As zonas corticais são responsáveis pela produção de mineralocorticoides, glicocorticoides e andrógenos, respectivamente (BANKS, 1991; GUYTON; HALL, 2006).

A medula adrenal, por sua vez, encontra-se localizada na região central da glândula, sendo derivada da ectoderma da crista neural e formada principalmente

por células prismáticas com núcleo grande vesicular e citoplasma basófilo, chamadas de células cromafins ou feocrômicas, sendo responsáveis pela produção das catecolaminas noradrenalina e adrenalina (BANKS, 1991; DYCE; SACK; WENSING, 2004; GUYTON; HALL, 2006).

As adrenais estão intrinsecamente relacionadas à resposta do organismo ao estresse, sendo parte dos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e simpaticoadrenomedular (SAM) (RIEGLE, 1973; AXELROD; REISINE, 1984). Embora as três zonas do córtex possam ser ativadas pelo estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a zona fasciculada é a que apresenta maior resposta, principalmente em casos de estresse prolongado, resultando no aumento da produção e da liberação de cortisol (RIEGLE, 1973; AXELROD; REISINE, 1984; WHITWORTH et al., 2003; QUAN et al., 2014). Há numerosos estudos em relação ao eixo HPA e à resposta do organismo frente a estímulos estressores variados, de naturezas diversas e por períodos variáveis, como jejum, som, frio, calor, imobilização, presença de doenças crônicas, dentre outros. Tais estudos, realizados em humanos ou em diversos modelos animais, apresentam resultados envolvendo alterações morfológicas ou funcionais nas glândulas adrenais em resposta aos agentes estressores estudados (RIEGLE, 1973; KUHAJDA; HUTCHINS, 1979; SWAIN, 2000; KOKO et al., 2004; ULRICH-LAI et al., 2006; POLITO et al., 2010; PETROVIC-KOSANOVIC et al., 2012).

Em relação às doenças crônicas, especificamente, há estudos relacionando enfermidades de curso prolongado, como artrite imunomediada, colestase hepática e infecções crônicas, com a redução significativa da síntese e da secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo (HARBUSZ et al., 1992; SWAIN et al., 1993; SWAIN; MARIC, 1995). A redução dos níveis de CRH pode estar associada a quadros de fadiga crônica, frequentemente presente em humanos acometidos por doenças crônicas (SWAIN, 2000). As doenças crônicas também não são incomuns em animais de companhia (MICHELL, 1999; OLSEN; ALLEN, 2000; GREENE, 2006), tendo especial relevância as disfunções cardíacas crônicas, principalmente em cães (WARE, 2007). Os cães apresentam, atualmente, maior expectativa de vida em relação às décadas passadas, o que reflete na maior ocorrência de doenças crônicas nestes animais, como as disfunções cardíacas e as insuficiências renais crônicas, dentre outras (MICHELL, 1999; MARCONDES; CORREA, 2014).

Desta forma, apesar de existirem diversos estudos referentes aos efeitos do estresse crônico sobre a função das adrenais em cães vivos (GARNIER et al., 1990; BEERDA et al., 1997, 1999), estudos com foco nas alterações morfométricas ou histopatológicas das adrenais em cães submetidos à necropsia estão ausentes.

O objetivo deste trabalho, portanto, é analisar e identificar possíveis alterações morfométricas e histopatológicas nas adrenais de cães submetidos a necropsias de rotina, e sua relação com o estresse prolongado sofrido pelo organismo na presença de doenças crônicas.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Animais

Foram amostrados 46 cães submetidos à necropsia no Serviço de Patologia Animal (SPA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) entre 2013 e 2014. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da FMVZ-USP (protocolo número 2350/2011).

Destes animais, 16 sofreram estresse agudo prévio ao óbito, sendo previamente saudáveis ou acometidos por doenças agudas, enquanto 30 cães vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas. Os cães foram divididos em grupo A e grupo B, respectivamente.

Os animais, dentre machos e fêmeas, apresentaram idade entre um mês a 16 anos, peso corpóreo entre 680 g a 58 kg e raças variadas, incluindo animais sem raça definida.

Para fins de comparação entre as diferentes idades dos animais em relação ao peso e às dimensões das adrenais, os animais foram divididos em faixas etárias, descritas a seguir: menor ou igual a 1 ano (filhotes), maior que 1 ano e menor ou igual a 3 anos (adultos jovens), maior que 3 anos e menor ou igual a 6 anos (adultos), maior que 6 anos e menor ou igual a 9 anos (adultos mais velhos), acima de 9 anos (idosos). Os animais também foram divididos de acordo com a faixa de peso corpóreo, sendo uma faixa até 10 kg e a outra acima de 10 kg.

3.2.2. Coleta de amostras e mensuração

Foram colhidas à necropsia 45 adrenais direitas (AD) e 43 adrenais esquerdas (AE) para a avaliação morfométrica e histopatológica, após descarte das glândulas com neoplasia ou autólise severa. O tecido adiposo adjacente foi removido e as adrenais foram pesadas individualmente em balança analítica de precisão 0,001 g. Cada adrenal foi mensurada em seus maiores eixos com o auxílio de um paquímetro para a determinação de seu comprimento, largura e espessura em centímetros.

3.2.3. Análises histopatológicas

As adrenais foram seccionadas transversalmente e fixadas em solução de formol a 10% por 24 a 48 horas, sendo posteriormente submetidas a processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo Leica® (Leica Biosystems, Illinois, EUA) gerando cortes de 5µm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas de vidro e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (HE). A coloração por Tricrômio de Masson foi utilizada para evidenciação das fibras colágenas nos processos de fibrose nas adrenais. As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio óptico trinocular Nikon Eclipse® Ni-U (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) por dois patologistas veterinários dentre os autores. As fotomicrografias foram obtidas por câmera digital acoplada Nikon DS Ri1-U3 (Nikon Corp., Tokyo, Japan) e software de captura Nikon NIS-F (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA).

3.2.4. Análises estatísticas

As comparações entre os pesos e as dimensões das adrenais direita e esquerda de um mesmo animal foram realizadas pelo teste t-pareado. O teste t não

pareado foi utilizado para comparar a idade dos animais e o peso corpóreo entre os grupos A e B, e também para as comparações entre o peso e as dimensões das adrenais entre os sexos e entre as glândulas com ou sem hiperplasia cortical.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para as comparações referentes ao comprimento e à largura das adrenais direitas entre os grupos A e B, enquanto as demais comparações referentes ao peso e dimensões das adrenais entre os grupos A e B foram realizadas através do teste t não pareado.

As correlações entre o peso corpóreo e o peso e dimensões das adrenais foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson.

O teste exato de Fisher foi utilizado para as comparações referentes ao sexo, raça, presença ou ausência de hiperplasia adrenocortical e achados histopatológicos entre os grupos A e B, e também entre os animais cardiopatas e não cardiopatas em relação aos achados histopatológicos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software analítico GraphPad Prism[®] versão 6 (San Diego, Califórnia, EUA), e apenas valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Animais

As informações referentes ao sexo, faixa etária e raça dos animais amostrados encontram-se sumarizadas na tabela 3.

Não houve diferença significativa em relação ao sexo e ao peso corpóreo entre os grupos A e B. Por outro lado, a raça e a idade dos animais exibiram diferenças significativas entre os grupos. As médias de idade e do peso corpóreo dos animais com os desvios padrão estão representadas nos gráficos 4 e 5, respectivamente.

As conclusões das necropsias dos 46 cães amostrados, divididos entre os grupos A e B, estão descritas na tabela 4.

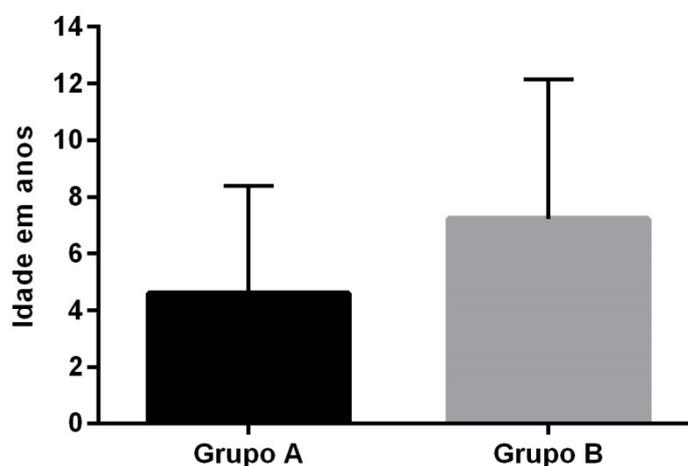
Tabela 3 - Distribuição dos 46 cães submetidos à necropsia no SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014 em relação ao sexo, faixa etária e definição de raça, entre os grupos A e B

| Parâmetros | Grupo A (n=16) | Grupo B (n=30) | Total (n=46) |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| Sexo[†] | | | |
| Macho | 11 (68,8) | 16 (53,3) | 27 (60,9) |
| Fêmea | 5 (31,3) | 14 (46,7) | 19 (39,1) |
| Faixa etária | | | |
| ≤ 1 ano | 6 (37,5) | 0 (0) | 6 (13,0) |
| > 1 ano e ≤ 3 anos | 3 (18,8) | 2 (6,7) | 5 (10,9) |
| > 3 anos e ≤ 6 anos | 1 (6,25) | 3 (10,0) | 4 (8,7) |
| > 6 anos e ≤ 9 anos | 3 (18,8) | 6 (20,0) | 9 (19,6) |
| > 9 anos | 3 (18,8) | 19 (63,3) | 22 (47,8) |
| Raça^{†*} | | | |
| Com raça definida (CRD) | 7 (43,8) | 25 (83,3) | 32 (69,6) |
| Sem raça definida (SRD) | 9 (56,2) | 5 (16,7) | 14 (30,4) |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: o grupo A é composto por animais que sofreram estresse agudo prévio ao óbito; o grupo B, por animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas. O número de animais é representado pelo número absoluto seguido pela porcentagem entre parênteses.
[†] Teste exato de Fisher para comparações referentes ao sexo ($p=0,2170$) e à definição de raça ($p=0,0084$) entre os grupos A e B. * Diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$).

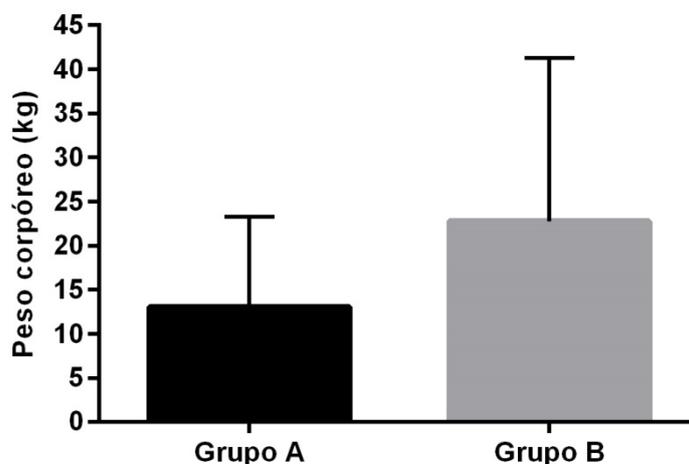
Gráfico 4 - Médias de idade dos grupos A e B



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: As barras representam as médias de idade com os respectivos desvios padrão. Teste t não pareado, com valor de $p<0,0001$. O grupo A é composto por 16 animais que sofreram estresse agudo prévio ao óbito; o grupo B, por 30 animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas.

Gráfico 5 - Médias de peso corpóreo dos grupos A e B



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: As barras representam as médias de peso corpóreo com os respectivos desvios padrão. Teste t não pareado, com valor de $p=0,0586$. O grupo A é composto por 16 animais que sofreram estresse agudo prévio ao óbito; o grupo B, por 30 animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas.

Tabela 4 - Conclusões das necropsias dos 46 cães submetidos ao SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014

| Conclusão da necropsia | Número de animais |
|----------------------------------------------------|-------------------|
| Grupo A | |
| Reação anafilática à vacina de raiva | 4 (8,7) |
| Enterocolite infecciosa aguda | 3 (6,5) |
| Septicemia | 2 (4,3) |
| Intoxicação exógena (carbamatos) | 2 (4,3) |
| Lesão cranioencefálica | 2 (4,3) |
| Pneumonia aguda | 1 (2,2) |
| Choque hipovolêmico por trauma (mordedura) | 1 (2,2) |
| Asfixia por afogamento | 1 (2,2) |
| Grupo B | |
| Alterações cardíacas crônicas | 19 (41,3) |
| Choque hipovolêmico por ruptura de neoplasias | 3 (6,5) |
| Metástases disseminadas | 3 (6,5) |
| Pneumonia crônica | 2 (4,3) |
| Nefropatia crônica | 1 (2,2) |
| Calcificação metastática (adenoma de paratireoide) | 1 (2,2) |
| Hipercortisolismo iatrogênico | 1 (2,2) |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: O número de animais é representado pelo número absoluto seguido pela porcentagem entre parênteses. O grupo A é composto por 16 animais que sofreram estresse agudo prévio ao óbito; o grupo B, por 30 animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas.

3.3.2. Análises morfométricas

As médias e os desvios-padrão dos pesos e dimensões das adrenais dos 46 cães encontram-se descritas na tabela 5.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os sexos para o peso e as dimensões das adrenais. Entre as faixas etárias, as adrenais mostraram diferenças significativas no peso ($p=0,0073$), comprimento ($p=0,0210$) e espessura ($p=0,0030$), sendo menos pesadas e menores nos animais filhotes (até 1 ano de idade) em relação aos animais adultos (entre 3 a 6 anos), adultos mais velhos (entre 6 a 9 anos) e idosos (acima de 9 anos), mas não em relação aos adultos jovens (entre 1 a 3 anos).

Não houve diferença significativa em relação às dimensões entre as adrenais esquerda e direita de um mesmo animal; a adrenal esquerda, porém, mostrou-se mais pesada do que a direita ($p=0,0158$).

Tabela 5 - Peso e dimensões de 45 adrenais direitas e 43 adrenais esquerdas de 46 cães submetidos à necropsia no SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014, divididos entre os grupos A e B

| | Grupo A | Grupo B | Valor de p |
|-------------------------------------|-----------|-----------|------------|
| Adrenal direita | | | |
| Peso (g) [†] | 0,83±0,46 | 1,25±0,75 | 0,0478* |
| Comprimento (cm) [‡] | 2,17±0,65 | 2,50±0,78 | 0,1281 |
| Largura (cm) [‡] | 1,20±0,33 | 1,37±0,43 | 0,2958 |
| Espessura (cm) [†] | 0,55±0,16 | 0,70±0,18 | 0,0064* |
| Adrenal esquerda[†] | | | |
| Peso (g) [†] | 0,81±0,46 | 1,32±0,82 | 0,0303* |
| Comprimento (cm) [†] | 2,18±0,63 | 2,45±0,79 | 0,2634 |
| Largura (cm) [†] | 1,16±0,32 | 1,25±0,41 | 0,4272 |
| Espessura (cm) [†] | 0,57±0,14 | 0,68±0,18 | 0,0359* |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: Os valores estão representados pela média ± desvio padrão. O grupo A é composto por 16 animais que sofreram estresse agudo prévio ao óbito; o grupo B, por 30 animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas. [†] Teste t não pareado. [‡] Teste de Mann-Whitney. * Diferença significativa entre os grupos A e B ($p<0,05$).

Houve diferença significativa em relação ao peso e à espessura das adrenais direita e esquerda entre os grupos A e B; porém, tendo em vista que as adrenais apresentaram correlações significativas ($p<0,0001$) com o peso corpóreo do animal (peso adrenal $r=0,82$; comprimento $r=0,78$; largura $r=0,68$; espessura $r=0,56$), as

comparações também foram realizadas com base na faixa de peso corpóreo, dividindo os animais em faixas de até 10 kg e acima de 10 kg.

Nas comparações referentes ao peso e às dimensões das adrenais realizadas na faixa de até 10 kg de peso corpóreo, as adrenais direitas do grupo B apresentaram maior peso em relação às do grupo A ($p=0,0222$), com as demais comparações não apresentando diferenças significativas. Na faixa acima de 10 kg, os animais do grupo B apresentaram adrenais com maior peso (AD $p=0,0166$; AE $p=0,0059$), comprimento AD ($p=0,0485$) e espessura AE ($p=0,0488$) em relação ao grupo A.

O grupo B também apresentou maior ocorrência de animais com hiperplasia adrenocortical ($p=0,0041$), e as adrenais mostraram diferenças significativas em relação ao seu peso e dimensões entre as glândulas com presença ou ausência de hiperplasia cortical, conforme representado na tabela 6.

Tabela 6 - Peso e dimensões das adrenais com presença ou ausência de hiperplasia cortical de 46 cães submetidos à necropsia no SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014

| | Sem hiperplasia cortical | Com hiperplasia cortical | Valor de p* |
|------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|
| Peso (g) | 0,75±0,47 | 1,14±0,72 | < 0,0001 |
| Comprimento (cm) | 2,10±0,65 | 2,66±0,70 | 0,0010 |
| Largura (cm) | 1,16±0,38 | 1,36±0,37 | 0,0283 |
| Espessura (cm) | 0,59±0,15 | 0,70±0,19 | 0,0030 |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: Os valores estão representados pela média ± desvio padrão. Teste de Mann-Whitney para a determinação do valor de p. * Todas as comparações apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.3.3. Análises histopatológicas

Os achados histopatológicos observados nas glândulas adrenais dos 46 cães amostrados no período encontram-se descritos na tabela 7. Todas as alterações histopatológicas foram analisadas por coloração de hematoxilina e eosina (HE) e, no caso da fibrose, também por tricrômio de Masson (TM).

Não houve diferença significativa entre as glândulas direita e esquerda de um mesmo animal em relação aos achados histopatológicos pesquisados.

Tabela 7 - Achados histopatológicos nas glândulas adrenais de 46 cães submetidos à necropsia no SPA da FMVZ-USP entre 2013 e 2014, divididos entre os grupos A e B

| Achados histopatológicos | Grupo A | Grupo B | Valor de p |
|-------------------------------------|-----------|-----------|------------|
| Necrose | 2 (12,5) | 12 (40,0) | 0,0915 |
| Fibrose | 0 (0) | 23 (76,7) | < 0,0001* |
| Congestão grave | 13 (81,3) | 13 (43,3) | 0,0272* |
| Hemorragia | 2 (12,2) | 4 (13,3) | 1,0000 |
| Siderófagos | 1 (6,3) | 6 (20,0) | 0,3938 |
| Hiperplasia cortical | 4 (25,0) | 22 (73,3) | 0,0041* |
| Focos de depleção vacuolar cortical | 4 (25,0) | 14 (46,7) | 0,2099 |
| Infiltrado inflamatório | 0 (0) | 13 (43,3) | 0,0015* |
| Precusores hematopoiéticos | 0 (0) | 4 (13,3) | 0,2820 |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: O número de animais é representado pelo número absoluto seguido pela porcentagem entre parênteses. O grupo A é composto por 16 animais que sofreram estresse agudo prévio ao óbito; o grupo B, por 30 animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas. Teste exato de Fisher para determinação do valor de p. *Diferença significativa entre os grupos A e B ($p < 0,05$).

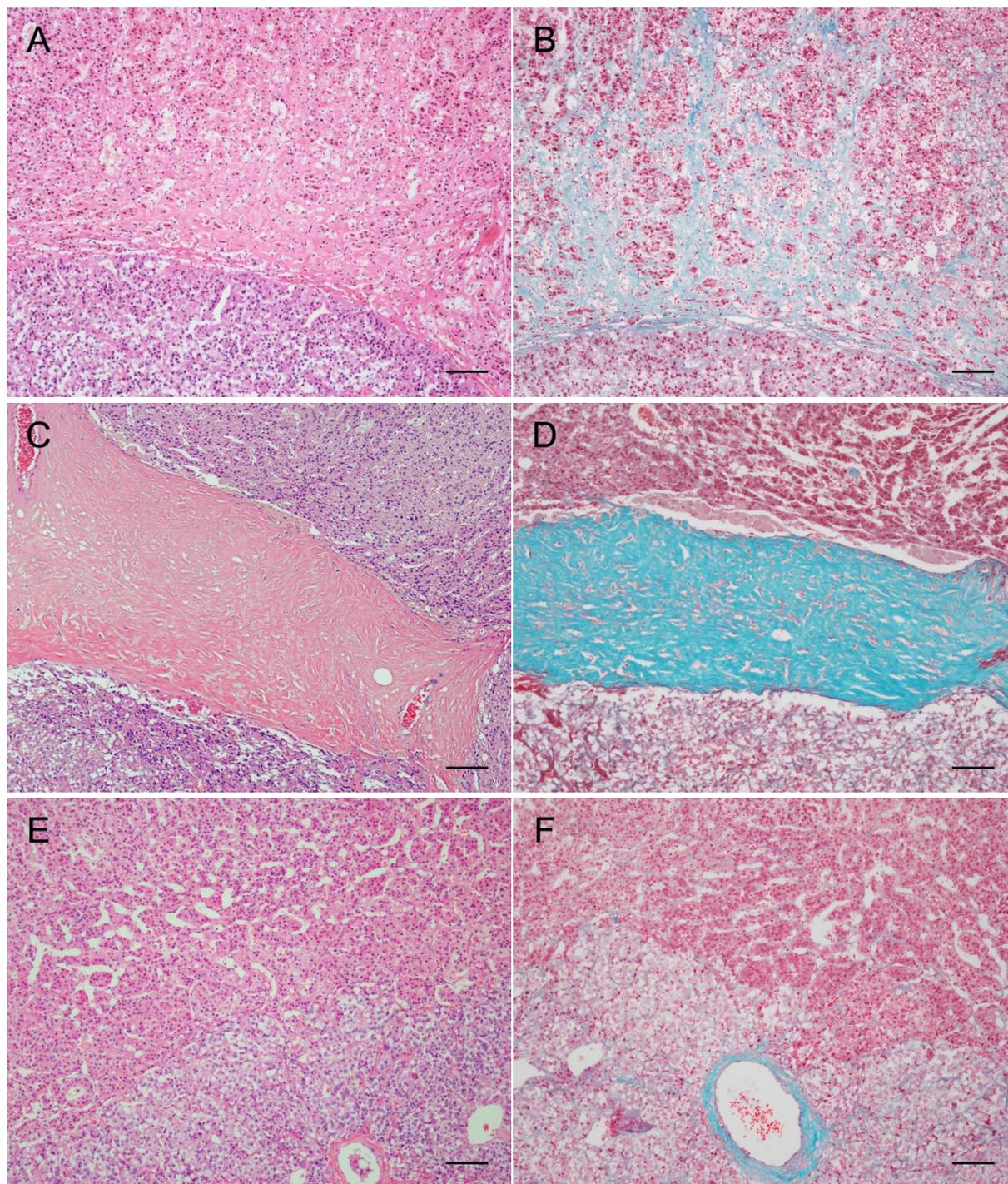
A necrose observada nas glândulas adrenais amostradas era do tipo coagulativa, e vista principalmente na zona reticulada (Figura 1A). As células necróticas foram frequentemente substituídas por colágeno, gerando áreas de fibrose na região de junção corticomedular, evidenciadas pela coloração por Tricrômio de Masson (Figura 1B), por vezes acompanhadas por infiltrado de macrófagos. Tais áreas ocasionalmente formavam pseudocápsulas ao redor da região medular (Figuras 1C e 1D). Este achado era mais frequente em cães com alterações cardíacas crônicas ($p=0,0002$), sendo bastante distinto do estroma fibrovascular normal da região (Figuras 1E e 1F). Animais com alterações cardíacas crônicas também apresentaram necrose adrenal com maior frequência ($p=0,0256$). Não foi observada fibrose nas adrenais dos animais do grupo A.

Graus variáveis de congestão foram frequentemente observados na zona reticulada e medula das glândulas adrenais, estando ausentes apenas em animais que vieram a óbito por choque hipovolêmico.

As áreas de hemorragia eram ocasionalmente acompanhadas por siderófagos e vistas principalmente em nódulos hiperplásicos corticais.

A hiperplasia adrenocortical mostrou-se geralmente bilateral, composta por nódulos únicos ou múltiplos com diâmetros variáveis, envolvendo principalmente as zonas fasciculada e reticulada.

Figura 1 - Necrose e fibrose em adrenais de cães submetidos à necropsia

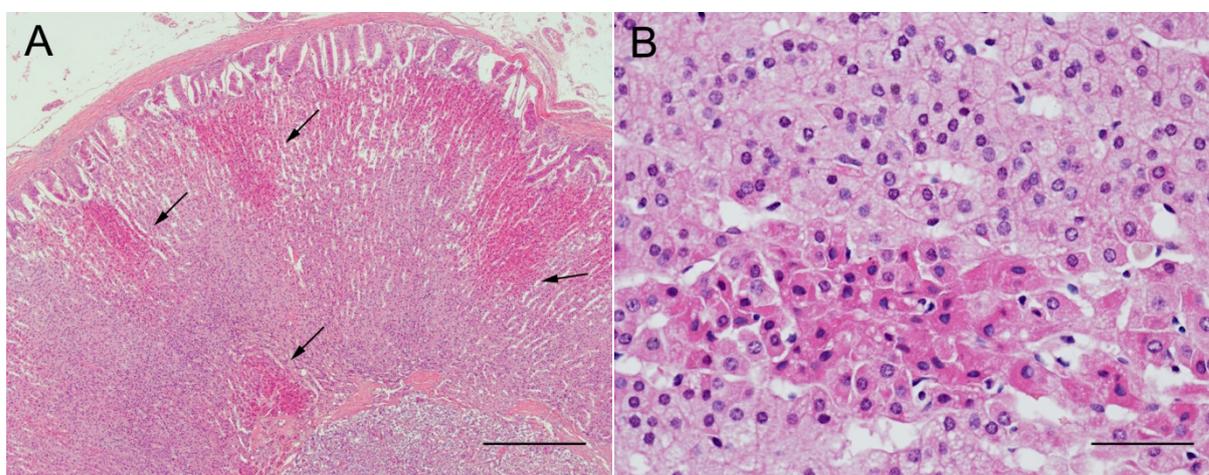


Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: Glândulas adrenais, cão. **A:** Necrose de coagulação em zona reticulada, com substituição do tecido normal por fibras colágenas. Coloração por hematoxilina e eosina (HE). **B:** Evidenciação das fibras colágenas em A por Tricrômio de Masson (TM). **C:** Fibrose exuberante em região de junção corticomedular em um cão com alteração cardíaca crônica. HE. **D:** Evidenciação das fibras colágenas em C por TM. **E:** Adrenal normal de um cão com morte súbita, sem áreas de necrose ou fibrose em região de junção corticomedular. HE. **F:** Mesma adrenal de E. Estroma fibrovascular normal da região corticomedular pouco evidenciado por TM. Barra = 100 µm.

A depleção vacuolar cortical observada é caracterizada por células corticais com citoplasma retraído e intensamente eosinofílico, devido à ausência dos vacúolos repletos de lipídios característicos da zona fasciculada, conforme ilustrado na figura 2. Os animais com alterações cardíacas crônicas apresentaram depleção vacuolar cortical com maior frequência do que os animais sem alterações cardíacas ($p=0,0288$).

Figura 2 - Depleção vacuolar cortical em adrenais de cães



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: Glândulas adrenais, cão. **A:** Áreas de depleção vacuolar em zona fasciculada, próximas à zona glomerulosa e reticulada (setas), em cão com alteração cardíaca crônica. **B:** Detalhe da Figura A. As células com depleção vacuolar mostram citoplasma retraído e intensamente eosinofílico, com ausência dos vacúolos lipídicos presentes nas células vizinhas. Hematoxilina e eosina. Barra A = 500 μm . Barra B = 50 μm .

Infiltrados de células inflamatórias ou de precursores hematopoiéticos não foram observados nas adrenais do grupo A; contudo, esta diferença foi significativa apenas em relação ao infiltrado inflamatório ($p = 0,0444$).

Não houve diferença significativa nas comparações morfométricas e histopatológicas entre os animais previamente saudáveis ao óbito e aqueles que morreram por doenças agudas.

3.4. DISCUSSÃO

Este estudo analisou as alterações morfométricas e histopatológicas nas adrenais de cães submetidos a necropsias de rotina, em relação à presença ou ausência de doenças crônicas.

Em relação às características dos animais amostrados, não houve diferença significativa entre os grupos A e B em relação ao sexo e ao peso corpóreo; porém, em relação à definição de raça, o grupo A apresentou maior ocorrência de animais SRD quando comparado ao grupo B. Dentre os animais do grupo A, havia cães que vieram a óbito em decorrência de intoxicações exógenas ou trauma, e há estudos que indicam um maior risco de ocorrência de lesões não-acidentais em cães e gatos mestiços (MUNRO; THRUSFIELD, 2001a; DE SIQUEIRA et al., 2012). Além disso, quatro dos animais do grupo A vieram a óbito em decorrência de reação anafilática à vacina de raiva, e os cães SRD costumam ser preferidos pelas populações com menor poder aquisitivo (MUNRO; THRUSFIELD, 2001a, 2001b), que são o público-alvo das campanhas de vacinação gratuitas ou de baixo custo (DAVLIN; VONVILLE, 2012).

A média de idade dos animais apresentou diferença significativa entre os grupos A e B, sendo os cães do grupo B mais velhos (10,4 anos) do que os do grupo A (4,7 anos). Este achado é compatível com o fato de que os animais do grupo B apresentavam doenças crônicas, as quais são mais comumente observadas em animais mais velhos (GREENE, 2006; WARE, 2007). Ademais, animais mais jovens são comumente mais suscetíveis a infecções agudas (GREENE; APPEL, 2006; MCCAWE; HOSKINS, 2006) ou apresentam maior risco de sofrerem lesões não acidentais (MUNRO; THRUSFIELD, 2001a; DE SIQUEIRA et al., 2012), resultando na menor média de idade do grupo A, composto por estes animais.

O peso e as dimensões das adrenais encontrados neste estudo são compatíveis com as médias descritas na literatura para a espécie canina (BAKER, 1937; GROOTERS; BILLER; MERRYMAN, 1995). Entretanto, diferente dos achados de Baker (1937), não houve diferença significativa entre os sexos em relação ao peso ou às dimensões das adrenais.

Conforme apresentado na tabela 5, houve diferença significativa entre os grupos A e B em relação ao peso e espessura das adrenais. Porém, os animais do

grupo B apresentaram maior média de peso corpóreo (22,8 kg) em relação ao grupo A (13,1 kg) e, ainda que a diferença não fosse significativa, o valor de p se mostrou bastante limítrofe ($p = 0,0586$) para esta comparação. Desta forma, uma vez que houve correlação entre o peso e as dimensões das adrenais e o peso corpóreo dos animais, estes achados podem não estar relacionados, necessariamente, à presença ou à ausência de doenças crônicas. Mesmo quando os animais foram divididos com base nas faixas de peso corpóreo, houve diferença significativa apenas em relação ao peso das adrenais nas duas faixas de peso corpóreo, e em relação ao comprimento AD e espessura AE na faixa acima de 10 kg.

O grupo B também apresentou maior frequência de hiperplasia adrenocortical, e as glândulas hiperplásicas apresentaram significativamente maior peso, comprimento, largura e espessura do que as glândulas sem hiperplasia, à semelhança do encontrado por estudos ultrassonográficos em adrenais de cães (GROOTERS; BILLER; MERRYMAN, 1995; CHOI; KIM; YOON, 2011).

Desta forma, tendo em vista a análise da relação entre as características morfométricas das adrenais e sua relação com os períodos de estresse sofridos pelo animal, é importante ressaltar que, apesar de haver estudos descrevendo alterações no tamanho das adrenais em relação a períodos de estresse agudo ou crônico em ratos (DUMM; LAKEN; RALLI, 1955; SELYE, 1956; ULRICH-LAI et al., 2006), os cães submetidos a necropsias de rotina não provêm de um ambiente controlado, e apresentam uma grande variedade de idades, raças e pesos corpóreos, que influenciam fortemente o peso e as dimensões das adrenais, conforme reforçado pelo presente estudo. Consequentemente, é necessária cautela na descrição de alterações morfométricas nas adrenais de cães na tentativa de correlacioná-las com o estresse agudo ou crônico sofrido pelo animal antes do óbito.

A necrose observada na zona reticulada das adrenais é compatível com os achados em humanos com hipotensão (KUHAJDA; HUTCHINS, 1979). A necrose coagulativa nas adrenais pode ser resultado da exposição celular prolongada à hipóxia, devido ao desequilíbrio entre a concentração reduzida de oxigênio na circulação sanguínea e a demanda aumentada por oxigênio pelas células adrenais em situações de estresse (KUHAJDA; HUTCHINS, 1979). Esta hipótese é compatível com a localização da necrose coagulativa observada nas adrenais, uma vez que a zona reticulada é a última a receber sangue oxigenado, devido à vascularização e circulação sanguínea típicas destas glândulas (BASSETT; WEST,

1997; ROSOL et al., 2001). A maior parte dos animais com necrose também apresentaram doenças cardiovasculares crônicas (69%), que podem resultar em hipóxia tecidual sistêmica (WARE, 2007).

Apenas dois animais do grupo A apresentaram necrose em adrenal, sendo um caso de intoxicação exógena por carbamatos e um caso de asfixia por afogamento, sendo as duas condições comumente caracterizadas por hipóxia tecidual (RISHER; MINK; STARA, 1987; DIMAIO; DIMAIO, 2001).

A necrose coagulativa observada neste estudo difere das lesões encontradas em adrenais expostas a substâncias químicas exógenas (SZABO; LIPPE, 1989), septicemia ou altos níveis de hormônio adrenocorticotrófico (RAO, 1995), uma vez que a necrose observada se encontrava especificamente na região corticomedular e o infiltrado inflamatório associado era discreto, composto principalmente por macrófagos e sem hemorragia associada.

As células necróticas foram frequentemente substituídas por fibras colágenas nas adrenais, resultando em fibrose da zona reticulada, o que também foi observado em humanos com hipotensão (KUHAJDA; HUTCHINS, 1979). Estudos relacionados ao estresse térmico em ratos também descreveram a indução de fibrose nas adrenais (KOKO et al., 2004), porém, com um padrão mais difuso, ao invés da localização específica na região corticomedular observada neste estudo.

Os animais do grupo A não apresentaram fibrose em adrenais, reforçando a hipótese de que este achado está associado à presença de doenças crônicas, especialmente de origem cardíaca, uma vez que os achados de necrose e fibrose em adrenais estiveram frequentemente associados à ocorrência de alterações cardíacas crônicas neste estudo. A maior frequência e gravidade da fibrose nas adrenais de cães com alterações cardíacas crônicas podem estar associadas ao período prolongado de congestão e hipóxia sistêmicas causadas por estas condições, as quais podem persistir por anos na forma subclínica (WARE, 2007).

Focos de congestão nas adrenais foram visualizados com maior gravidade no grupo A, o qual incluía animais que vieram a óbito em decorrência de choque anafilático ou intoxicação por carbamatos, casos que são frequentemente caracterizados por vasodilatação em múltiplos órgãos (RISHER; MINK; STARA, 1987; MORANVILLE; MIEURE; SANTAYANA, 2011).

A hemorragia cortical adrenal pode ser observada como parte da fase de exaustão na resposta ao estresse, tanto em animais silvestres que vêm a óbito após

a captura ou cavalos que morrem após exercício excessivo (CAPEN, 2007). Neste estudo, focos de hemorragia adrenal foram observados apenas em dois cães que morreram por trauma, dois por eutanásia, um por choque cardiogênico e um por insuficiência respiratória, e tais hemorragias estavam frequentemente associadas a nódulos corticais hiperplásicos. Endotoxemia e septicemia também podem causar hemorragia em córtex adrenal (RAO, 1995; POLITO et al., 2010); neste estudo, contudo, não foram observados focos de hemorragia ou siderófagos nas adrenais de cães que morreram por sepse. É interessante ressaltar que os achados de hemorragia entre os grupos A e B mostraram valor de $p = 1,000$; desta forma, apesar da hemorragia adrenal ser comumente associada a situações de estresse em ratos, em decorrência dos estudos originais de Hans Selye (1956), não é recomendada a utilização deste achado na espécie canina como parâmetro de indicação do estresse sofrido pelo animal.

A hiperplasia nodular adrenocortical é visualizada com frequência de maneira espontânea em cães com idades avançadas (CAPEN, 2007). O grupo B apresentou maior ocorrência de nódulos hiperplásicos adrenocorticais e, ainda que a diferença não tenha sido significativa, este grupo também apresentou maior média de idade (10,4 anos). Nenhum dos animais apresentou histórico ou sinais de síndrome de Cushing, exceto por um Rottweiler com hipercortisolismo iatrogênico e atrofia do córtex adrenal. Não foram constatadas neoplasias de hipófise em nenhum dos cães amostrados, o que reforça a ocorrência dos nódulos hiperplásicos adrenocorticais devido à idade avançada dos animais. A média da espessura das adrenais com hiperplasia em relação às adrenais não hiperplásicas corrobora os estudos ultrassonográficos de Grooters et al. (1995) e Choi et. al (2011), os quais indicam que o limite de espessura normal da adrenal de 0,75 cm proposto por Barthez et al. (1995) seria muito elevado, podendo omitir o diagnóstico de cães com hiperplasia cortical adrenal (GROOTERS; BILLER; MERRYMAN, 1995; CHOI; KIM; YOON, 2011).

Áreas de depleção vacuolar cortical nas adrenais são observadas em situações de recuperação de estresse intenso, indicando alto metabolismo de cortisol (LACK, 2007). Em humanos, a depleção vacuolar é um achado frequente em casos de septicemia, porém de forma difusa (POLITO et al., 2010). Neste estudo, a depleção vacuolar foi observada com distribuição focal ou multifocal, e apesar de não haver diferença significativa na ocorrência entre os grupos, este achado era

geralmente mais exuberante no grupo B, principalmente em animais com alterações cardíacas crônicas, conforme ilustrado pela figura 2.

As células inflamatórias observadas nas adrenais podem refletir a inflamação em outros tecidos, como nas inflamações sistêmicas ou retroperitoneais (LACK, 2007), enquanto os precursores hematopoiéticos podem ser vistos de maneira espontânea nas adrenais, caracterizando um quadro de hematopoiese extramedular (ROSOL et al., 2001). Não foi observado infiltrado inflamatório no grupo A, o que é compatível com o fato de que esses animais eram previamente saudáveis ao óbito ou apresentavam doenças agudas não sistêmicas e não localizadas em região retroperitoneal. Em relação ao infiltrado de precursores hematopoiéticos, apesar deste também não ter sido observado nos animais do grupo A, a diferença não foi significativa, uma vez que este achado também foi pouco frequente no grupo B, e geralmente associado à hematopoiese extramedular visualizada em outros órgãos, como o baço.

3.5. CONCLUSÃO

As características morfométricas das adrenais dos cães apresentaram maior influência pelo peso corpóreo do animal e pela presença ou ausência de hiperplasia cortical do que pela associação com doenças prévias ou pelo período de sobrevivência. Não é recomendado, portanto, que as informações referentes ao peso ou dimensões das adrenais de cães à necropsia sejam utilizados isoladamente como parâmetros para indicação de relação com situações de estresse prévias ao óbito, devido à marcante variedade de raças e portes nesta espécie. Seriam necessários, portanto, estudos futuros com cada raça, faixa etária e faixa de peso corpóreo de cães para detecção de possíveis alterações sutis na morfometria adrenal em relação ao estresse sofrido em vida pelo animal.

Em relação aos achados histopatológicos, cães previamente saudáveis que sofreram morte súbita ou que vieram a óbito por doenças agudas apresentaram congestão adrenal severa com maior frequência, enquanto os animais que morreram em decorrência de complicações de doenças crônicas exibiram maior ocorrência de

hiperplasia adrenocortical. A fibrose em região corticomedular e os infiltrados inflamatórios foram observados somente em animais com doenças crônicas.

Os cães que vêm a óbito em decorrência de alterações cardíacas crônicas são frequentemente identificados pelo proprietário como animais previamente saudáveis com morte súbita; porém, apesar desta condição cardíaca poder ser clinicamente silenciosa por anos, as adrenais destes animais apresentaram alterações histopatológicas significativas marcantes, como necrose, fibrose e depleção vacuolar cortical.

Estes achados podem auxiliar as conclusões da necropsia, sendo especialmente relevantes em casos médico-legais, nos quais todos os achados possíveis devem ser relatados e analisados a fim de se prover um diagnóstico preciso, seguro e inequívoco.

4 EFEITOS DO ESTRESSE CAUSADO POR DOENÇAS CRÔNICAS NA PROLIFERAÇÃO E NA APOPTOSE DE CÉLULAS DO CÓRTEX ADRENAL DE CÃES: ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE PCNA, BAX E BCL-2

4.1. INTRODUÇÃO

As glândulas adrenais respondem a situações de estresse sofridas pelo organismo através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e do eixo simpaticoadrenomedular (SAM) (AXELROD; REISINE, 1984). As respostas das adrenais ao estresse podem ser não só funcionais, com a liberação de hormônios como o cortisol, ou das catecolaminas noradrenalina e adrenalina, como também podem envolver alterações estruturais e morfológicas, como hiperplasia das células corticais ou apoptose (BOZZO et al., 2006; ULRICH-LAI et al., 2006; ARPITA SARKAR, MANJARI CHATTERJEE, 2014; PATRA; RATH; DUTTA, 2015).

Há estudos sobre os efeitos do estresse sobre a proliferação e a morte celular programada no córtex adrenal em humanos com depressão que cometeram suicídio (WILLENBERG et al., 1998; ARPITA SARKAR, MANJARI CHATTERJEE, 2014; PATRA; RATH; DUTTA, 2015) ou em ratos que sofreram imobilização prolongada (BOZZO et al., 2006; ULRICH-LAI et al., 2006).

O estresse sobre o organismo pode ser gerado não só por fontes externas, mas também por doenças crônicas (KUHAJDA; HUTCHINS, 1979; SWAIN; MARIC, 1995; SWAIN, 2000; YU et al., 2012). O aumento da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que resulta em uma maior produção e liberação de cortisol pelas células fasciculadas do córtex adrenal, também leva à hipertrofia e hiperplasia destas células, principalmente se o estímulo for prolongado (ULRICH-LAI et al., 2006; ARPITA SARKAR, MANJARI CHATTERJEE, 2014; PATRA; RATH; DUTTA, 2015). Por outro lado, algumas condições patológicas, como doenças inflamatórias, hipotensão e hipóxia, podem levar à estimulação de apoptose nas células do córtex adrenal (WILLENBERG et al., 1998; BOZZO et al., 2006; YU et al., 2012).

A manutenção normal da população celular do córtex adrenal é representada pelo balanço entre a proliferação e a morte celular. Dentre as teorias de remodelamento tecidual adrenal, a teoria da migração é a que atualmente apresenta maior aceitação científica (WOLKERSDÖRFER; BORNSTEIN, 1998). Nesta teoria, as células da zona glomerulosa dão origem às células das demais zonas corticais conforme migram em direção à zona reticulada. Todas as camadas do córtex adrenal, porém, podem sofrer apoptose e hiperplasia de maneira independente (WOLKERSDÖRFER et al., 1996; WOLKERSDÖRFER; BORNSTEIN, 1998).

O estudo de proliferação e apoptose celulares em cortes histológicos pode ser realizado através da avaliação de marcadores imunoistoquímicos, como PCNA e BAX e Bcl-2, respectivamente (FOGT et al., 1998; HOETELMANS et al., 2000; MADEWELL, 2001; BERNINI et al., 2002; BOZZO et al., 2006).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) está envolvido na síntese e no reparo de DNA durante a proliferação celular, sendo detectado desde a fase G1 até a transição G2 a M, atingindo seu pico na fase S do ciclo celular (MADEWELL, 2001). A proteína Bcl-2, por sua vez, é inibidora de apoptose, conferindo resistência celular à morte programada (HOCKENBERY et al., 1993; YANG; KORSMEYER, 1996), e sua imunorreatividade é observada no tecido cortical adrenal normal (FOGT et al., 1998). A proteína BAX, homóloga à Bcl-2, é considerada pró-apoptótica, uma vez que inibe a função anti-apoptótica de Bcl-2 (OLTVAI; MILLIMAN; KORSMEYER, 1993).

O objetivo deste estudo é avaliar, através da marcação imunoistoquímica por PCNA, BAX e Bcl-2, a proliferação celular e a apoptose em córtex de adrenais de cães que sofreram estresse prolongado gerado pela presença de doenças crônicas, em comparação a cães que sofreram estresse agudo, sendo previamente saudáveis ao óbito ou acometidos por doenças agudas, a fim de se analisar o efeito do estresse causado por doenças crônicas sobre a população celular cortical das glândulas adrenais de cães.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Animais e amostras

Foram colhidas as adrenais de 44 cães submetidos à necropsia de rotina no Serviço de Patologia Animal da FMVZ-USP entre 2013 e 2014, avaliadas previamente por exame histopatológico com coloração por hematoxilina e eosina. Para a marcação imunoistoquímica, foram priorizadas as adrenais direitas dos animais para amostragem, uma vez que as neoplasias adrenais, quando presentes, eram frequentemente observadas nas glândulas esquerdas.

Os cães amostrados eram compostos por 26 machos (59,1%) e 18 fêmeas (40,9%). Trinta e um dos cães possuíam raça definida (70,5%), enquanto 13 eram sem raça definida (SRD) (29,5%). Em relação às faixas etárias, 10 cães apresentaram idade menor ou igual a 3 anos (22,7%), 13 acima de 3 anos e menor ou igual a 9 anos (29,5%) e 21 acima de 9 anos (47,7%).

Dos 44 cães, 15 sofreram estresse agudo prévio ao óbito, sendo previamente saudáveis ou acometidos por doenças agudas, enquanto 29 cães vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas. Os cães foram divididos em grupo A e grupo B, respectivamente.

4.2.2. Marcações imunoistoquímicas

Os blocos de parafina das 44 adrenais selecionadas foram seccionados em micrótomo Leica[®] (Leica Biosystems, Illinois, EUA) gerando cortes de 5µm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas silanizadas StarFrost Knittel[®] e aquecidos em estufa a 60 °C por 2 a 3 horas. Os cortes foram desparafinados em xilol e posteriormente reidratados em álcool com graduação decrescente até a água destilada. A recuperação antigênica foi obtida através do aquecimento dos cortes histológicos em solução de tampão citrato pH 6,0 por 30 min a 100 °C.

Os cortes foram posteriormente submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol por 30 minutos. Para bloqueio das reações inespecíficas, os cortes histológicos foram imersos em solução de leite desnatado (Molico[®]) 5% por 25 minutos. As lâminas foram então incubadas com os seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal de coelho para PCNA (1:100; Dako[®], clone PC10) e anticorpos policlonais de coelho BAX (1:100; Santa Cruz[®], clone N-20) e Bcl-2 (1:100; Santa Cruz[®], clone N-19) por 14 horas a 4 °C e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário biotilado e complexo estreptavidina-HPR do kit LSAB[®] (Dako[®]), seguindo as instruções do fabricante. A revelação foi obtida por cromógeno vermelho (Vector NovaRed[®]), seguindo as instruções do fabricante, e a contracoloração foi feita com hematoxilina.

Os controles positivos utilizados foram carcinoma mamário canino para PCNA e intestino canino para BAX e Bcl-2, sendo também utilizados como controles negativos por ausência de incubação com o anticorpo primário.

Os cortes foram analisados em microscópio Nikon Eclipse[®] 80i (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). As fotomicrografias foram obtidas com uso de câmera digital acoplada Nikon[®] DXM1200C (Nikon Corp., Tokyo, Japan) e software de captura Nikon[®] ACT-1C (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA).

4.2.3. Avaliações imunoistoquímicas

A expressão de BAX e Bcl-2 foi analisada de forma qualitativa e semi-quantitativa em 10 campos de aumento de 400x para cada adrenal. A análise qualitativa foi baseada na intensidade da marcação citoplasmática, sendo classificada em: 0, sem marcação; 1, marcação fraca; 2, marcação moderada; 3, marcação intensa. A análise semi-quantitativa baseou-se na porcentagem de células marcadas positivamente, sendo: 0, nenhuma célula marcada; 1, <25% das células marcadas; 2, 25 a 50% das células marcadas; 3, 50 a 75% das células marcadas; 4, acima de 75% das células marcadas (STREFEZZI; KLEEB; XAVIER, 2012).

A expressão de PCNA foi avaliada de forma quantitativa, com contagem dos núcleos marcados independente da intensidade de marcação. Para tanto, foram obtidas fotomicrografias de cinco campos de maior aumento (400x) das adrenais

marcadas, sendo selecionados aqueles campos com maior expressão do antígeno (“hot spots”) em córtex adrenal. A contagem dos núcleos marcados e negativos foi realizada com o software ImageJ versão FIJI (software de código aberto, Wisconsin, EUA), sendo expressa em porcentagem de núcleos marcados em relação ao total de núcleos contados.

4.2.4. Análises estatísticas

As comparações entre os sexos e entre os grupos A e B, em relação à porcentagem de marcação nuclear por PCNA, foram realizadas pelo teste t não-pareado. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os escores de intensidade de marcação por BAX e Bcl-2 entre os grupos A e B e entre os sexos. O teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para a comparação entre as diferentes faixas etárias, tanto em relação à porcentagem de marcação nuclear por PCNA, quanto aos escores de intensidade de marcação por BAX e Bcl-2.

Para todas as análises, apenas valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas no software analítico GraphPad Prism[®] versão 6 (San Diego, Califórnia, EUA).

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão para as análises de PCNA e mediana com valores máximos e mínimos dos escores para as análises de BAX e Bcl-2.

4.3. RESULTADOS

As conclusões das necropsias dos cães amostrados foram agrupadas de acordo com a lesão principal responsável pelo óbito do animal, tanto de forma direta, como nas septicemias ou intoxicações exógenas, por exemplo, quanto de forma indireta, no caso das eutanásias.

A tabela 8 apresenta a frequência das conclusões das necropsias de acordo com a divisão entre os grupos A e B.

Tabela 8 - Relação dos cães recebidos pelo Serviço de Patologia Animal - FMVZ-USP utilizados para coleta das adrenais, referente às causas de morte e diagnósticos morfológicos principais

| Conclusão da necropsia | Número de animais |
|----------------------------------------------------|-------------------|
| Grupo A | |
| Reação anafilática à vacina de raiva | 4 (26,7) |
| Enterocolite infecciosa aguda | 3 (20,0) |
| Septicemia | 2 (13,3) |
| Intoxicação exógena (carbamatos) | 2 (13,3) |
| Lesão cranioencefálica | 2 (13,3) |
| Choque hipovolêmico por trauma (mordedura) | 1 (6,7) |
| Asfixia por afogamento | 1 (6,7) |
| Grupo B | |
| Alterações cardíacas crônicas | 19 (65,5) |
| Choque hipovolêmico por ruptura de neoplasias | 3 (10,3) |
| Pneumonia crônica | 2 (6,9) |
| Metástases disseminadas | 2 (6,9) |
| Nefropatia crônica | 1 (3,4) |
| Calcificação metastática (adenoma de paratireoide) | 1 (3,4) |
| Hipercortisolismo iatrogênico | 1 (3,4) |

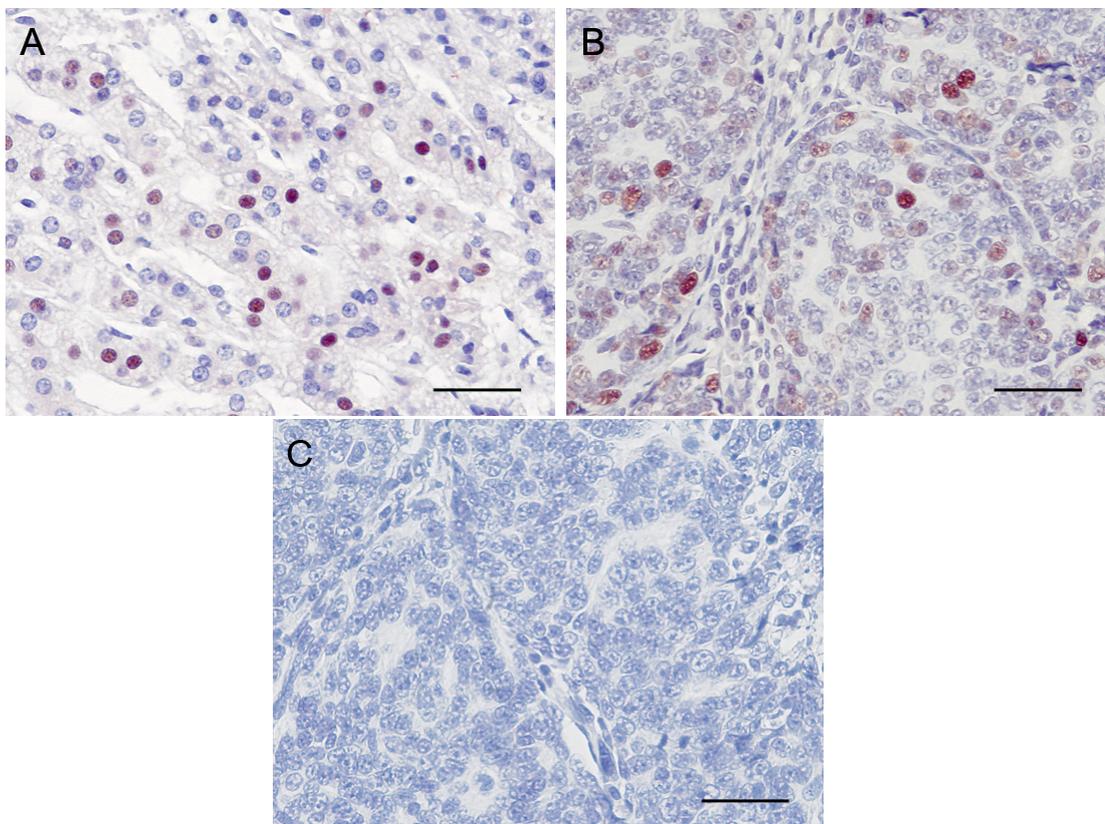
Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: o número de animais é representado pelo número absoluto seguido pela porcentagem entre parênteses. O grupo A é composto por 15 animais que sofreram estresse agudo prévio ao óbito; o grupo B, por 29 animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas.

A marcação por PCNA nas células do córtex adrenal é nuclear, conforme demonstrado na figura 3. As porcentagens de marcação de núcleos em córtex adrenal por PCNA em relação aos dois grupos estudados, aos sexos e às diferentes faixas etárias encontram-se representadas na tabela 9.

Foi observada marcação por PCNA mais frequente em zonas glomerulosa e fasciculada, e menos frequente em zona reticulada. A região medular não apresentou marcação nuclear para PCNA. Não foi observada marcação mais frequente em nódulos hiperplásicos. Não houve diferença significativa na porcentagem de núcleos em proliferação nas comparações realizadas entre os diferentes grupos.

Figura 3 - Fotomicrografias de marcação imunoistoquímica nuclear por PCNA em córtex adrenal de cão



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: Marcação imunoistoquímica nuclear por PCNA. A: Córtex adrenal de cão (animal nº 31). B: Carcinoma mamário de cão, controle positivo. C: Carcinoma mamário de cão, controle negativo. Contracoloração com hematoxilina. Barra = 50 µm.

Tabela 9 - Porcentagem de marcação imunoistoquímica nuclear para PCNA em córtex adrenal de cães submetidos à necropsia em relação aos grupos A e B, sexo e idade

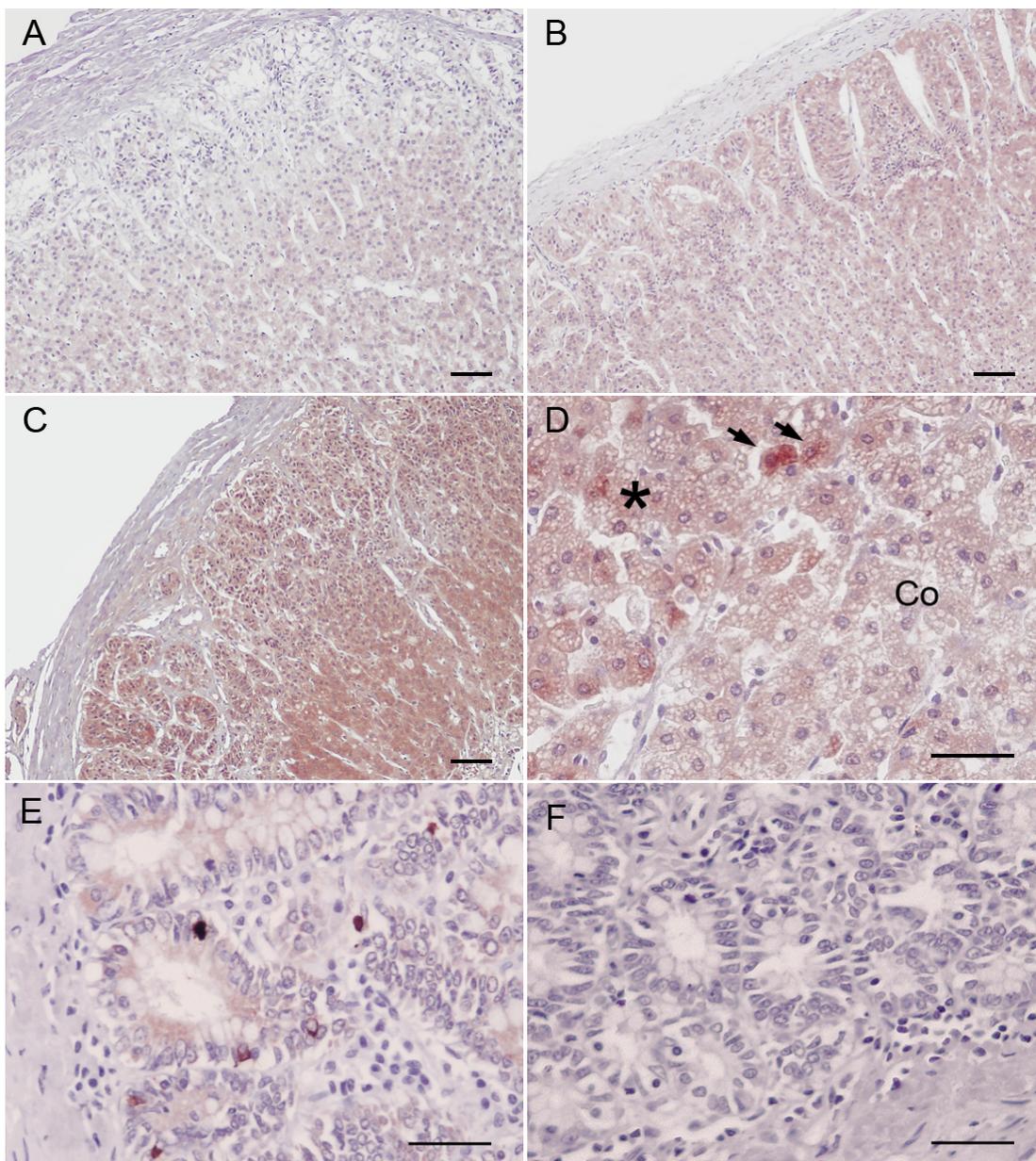
| Parâmetros | Porcentagem de núcleos marcados (%) |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Sexo [†] | |
| Macho | 38,8±18,7 |
| Fêmea | 37,5±23,9 |
| Faixa etária [‡] | |
| ≤ 3 anos | 30,4±19,2 |
| > 3 anos e ≤ 9 anos | 37,1±26,6 |
| > 9 anos | 42,6±21,0 |
| Grupos [†] | |
| Grupo A | 38,0±25,9 |
| Grupo B | 38,1±19,9 |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: valores representados como média ± desvio padrão. O grupo A é composto por 15 animais que sofreram estresse agudo prévio ao óbito; o grupo B, por 29 animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas. [†] Teste t não pareado para comparações entre o sexo (p=0,8662) e entre os grupos A e B (p=0,9938). [‡] Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações entre as faixas etárias (p=0,4696).

A marcação para BAX mostrou-se mais intensa na zona fasciculada e, ocasionalmente, em zona reticulada e próximo a nódulos hiperplásicos (Figura 4). Por outro lado, a zona glomerulosa apresentou marcação mais intensa para Bcl-2, assim como ocasionais nódulos hiperplásicos, quando presentes (Figura 5).

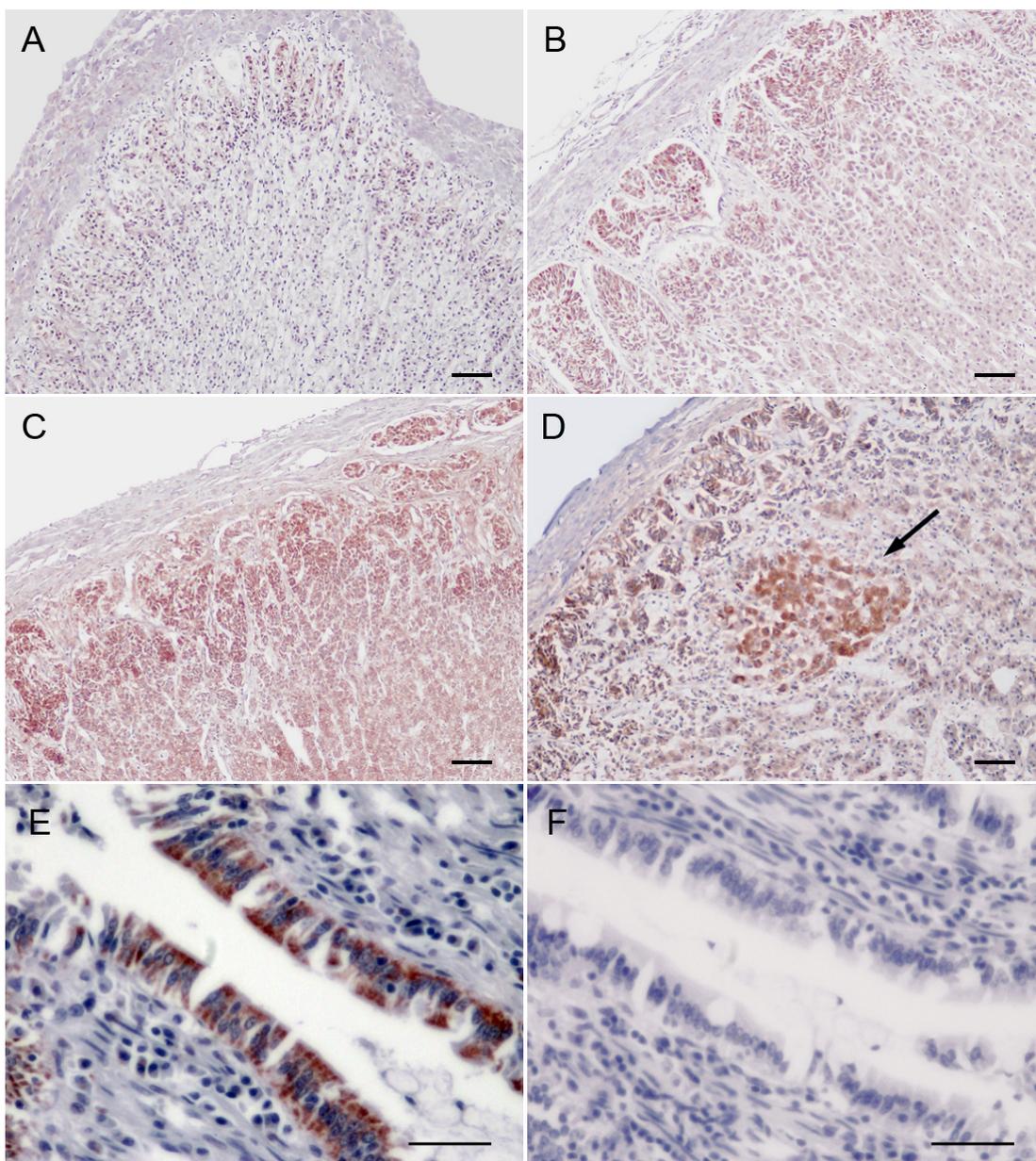
Figura 4 - Fotomicrografias de marcação imunoistoquímica citoplasmática por BAX em córtex adrenal de cão



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: Marcação imunoistoquímica citoplasmática por BAX. **A:** córtex adrenal de cão (animal nº 43). Marcação fraca (escore 1). **B:** córtex adrenal de cão (animal nº 41). Marcação moderada (escore 2). **C:** córtex adrenal de cão (animal nº 10). Marcação intensa (escore 3). **D:** córtex adrenal de cão (animal nº 2). Marcação intensa em células presentes na periferia de nódulo hiperplásico cortical (asterisco). Co: córtex normal. **E:** intestino delgado de cão, criptas. Controle positivo. **F:** intestino delgado de cão, criptas. Controle negativo. Contracoloração com hematoxilina. Barra = 50 µm.

Figura 5 - Fotomicrografias de marcação imunoistoquímica citoplasmática por Bcl-2 em córtex adrenal de cão



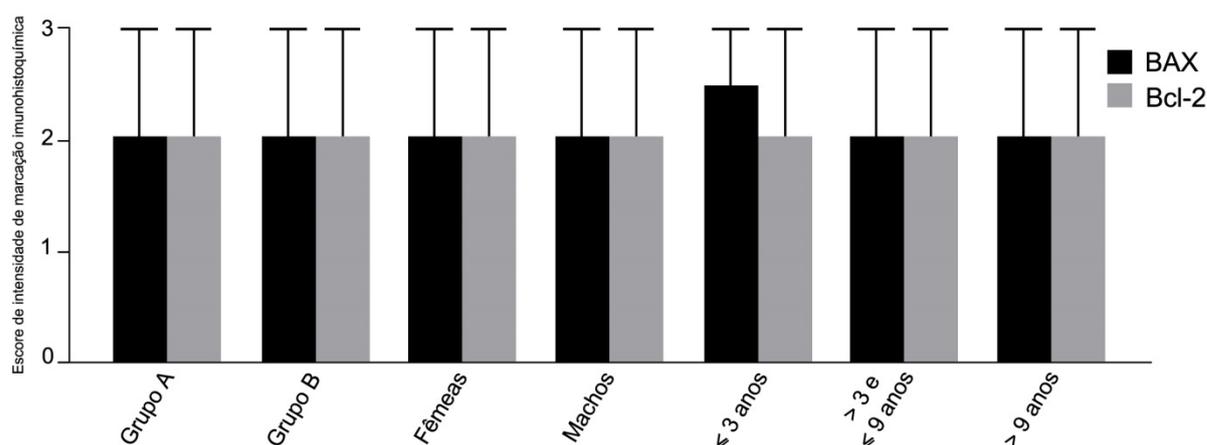
Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: Marcação imunoistoquímica citoplasmática por Bcl-2. **A:** córtex adrenal de cão (animal nº 34). Marcação fraca (escore 1). **B:** córtex adrenal de cão (animal nº 42). Marcação moderada (escore 2). **C:** córtex adrenal de cão (animal nº 10). Marcação intensa (escore 3), principalmente em zona glomerulosa. **D:** córtex adrenal de cão (animal nº 40). Marcação intensa em células presentes em nódulo hiperplásico cortical (seta). **E:** intestino delgado de cão, vilosidades. Controle positivo. **F:** intestino delgado de cão, vilosidades. Controle negativo. Contracoloração com hematoxilina. Barra = 50 µm.

Os escores de marcação para BAX e Bcl-2 em relação à análise semi-quantitativa entre os grupos estudados, entre os sexos e entre as diferentes faixas etárias encontram-se representados como mediana e valores máximos e mínimos no gráfico 6. Não houve diferença significativa nos escores de BAX e Bcl-2 nas comparações realizadas entre os diferentes grupos.

Em relação à análise qualitativa para ambos os anticorpos, todas as amostras apresentaram marcação de mais de 75% das células corticais (escore 4), enquanto a região medular das amostras mostrou marcação nula ou pouco frequente, com escore variando entre 0 a 1.

Gráfico 6 - Mediana dos escores de marcação para BAX e Bcl-2 em relação à análise semi-quantitativa entre os grupos A e B, entre os sexos e entre as diferentes faixas etárias



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: As barras representam as medianas, com valores máximos e mínimos dos escores. Teste de Mann-Whitney para as comparações entre os grupos A e B e entre os sexos, e teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para as comparações entre as diferentes faixas etárias, com valor de $p > 0,05$ para todas as comparações. O grupo A é composto por 15 animais que sofreram estresse agudo prévio ao óbito; o grupo B, por 29 animais que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas. As fêmeas são compostas por 18 animais, enquanto os machos, por 26. Dez dos cães apresentaram idade menor ou igual a 3 anos, 13 entre 3 a 9 anos e 21 acima de 9 anos.

4.4. DISCUSSÃO

Este estudo se propôs a avaliar os efeitos da presença de doenças crônicas sobre a proliferação celular e apoptose das células corticais adrenais de cães através da análise da marcação imunoistoquímica por PCNA, BAX e Bcl-2.

Neste estudo, a marcação imunoistoquímica para PCNA, um marcador de atividade proliferativa celular, foi observada em maior intensidade nas regiões glomerulosa e fasciculada do córtex adrenal, compatível com a manutenção normal da população celular da glândula (WOLKERSDÖRFER et al., 1996). Não houve diferença significativa, porém, entre o percentual de células corticais em proliferação entre os grupos A e B, assim como entre os sexos e as diferentes faixas etárias. Enquanto há estudos que demonstram a ação do estresse prolongado sobre a estrutura do córtex adrenal, por meio de hipertrofia e hiperplasia celulares, tais estudos são frequentemente realizados em ratos de laboratório, os quais apresentam pouca variação individual e são submetidos às mesmas condições quanto ao estímulo estressor (ULRICH-LAI et al., 2006). Com os atuais resultados, o índice de proliferação do córtex adrenal não apresentou potencial de utilização como parâmetro de estudo dos efeitos do estresse por doenças crônicas sobre as adrenais de cães.

A marcação imunoistoquímica para BAX e Bcl-2, marcadores pró e antiapoptóticos, respectivamente, também não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos, entre os sexos e entre as diferentes faixas etárias. Apesar do grupo de cães com até 3 anos de idade apresentar mediana de escore de intensidade de marcação para Bcl-2 ligeiramente maior (mediana 2,5) que os animais acima de 3 anos de idade (mediana 2), tal diferença também não se mostrou significativa.

A marcação mais intensa para BAX foi visualizada na zona fasciculada e, ocasionalmente, em zona reticulada e em regiões próximas a nódulos hiperplásicos, enquanto a marcação para Bcl-2 pôde ser vista com maior intensidade na zona glomerulosa e, ocasionalmente, de maneira difusa em nódulos hiperplásicos. Estas localizações relacionadas às marcações por BAX e Bcl-2 nas diferentes zonas do córtex adrenal são compatíveis com estudos anteriores referentes à manutenção da populacional celular adrenal (WOLKERSDÖRFER et al., 1996; WOLKERSDÖRFER;

BORNSTEIN, 1998). As marcações destas proteínas em relação aos nódulos hiperplásicos são compatíveis com o estado proliferativo destas células, enquanto as células localizadas na periferia de nódulos em crescimento podem sofrer ativação da apoptose em decorrência da compressão celular e da insuficiência de oxigênio e nutrientes (THOMPSON, 1995; QUAN et al., 2014).

A ausência de relação significativa entre os índices de apoptose nas adrenais quando realizada a comparação entre os diferentes grupos reduz o potencial destes marcadores para estudo dos efeitos do estresse por doenças crônicas sobre as adrenais de cães, à semelhança da marcação por PCNA.

4.5. CONCLUSÃO

A marcação imunoistoquímica por PCNA, BAX e Bcl-2 no córtex da adrenal de cães foi positiva e resultou em marcações bem definidas e facilmente detectáveis tanto no núcleo da célula, como no caso do PCNA, quanto no citoplasma, no caso dos anticorpos BAX e Bcl-2. Desta forma, indica-se como sugestão o uso destes anticorpos em estudos com adrenais de cães com o objetivo de analisar a manutenção da população normal da glândula e a resposta celular na presença de nódulos corticais hiperplásicos e neoplasias adrenocorticais. Os índices de proliferação e apoptose das células do córtex adrenal dos cães não apresentaram, porém, correlação com os efeitos do estresse por doenças crônicas sobre as adrenais. Há a possibilidade de que tais alterações possam ser mais sutis, sendo recomendados estudos futuros em populações homogêneas de cães submetidos às mesmas condições estressoras para detecção de possíveis alterações na população celular adrenal em resposta às condições patológicas sistêmicas agudas ou crônicas.

5 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ADRENALINA E NORADRENALINA NA MEDULA ADRENAL DE CÃES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA (CLAE-DE): RELAÇÃO COM O SEXO, IDADE E CAUSA DE MORTE DOS ANIMAIS

5.1. INTRODUÇÃO

A morte é um processo gradativo envolvendo a parada das funções cardíaca, respiratória e nervosa (FRANÇA, 2008). O estresse causado pelas condições críticas que levam à morte do organismo pode ser gerado pelo desconforto físico da dor intensa, por ansiedade na iminência da morte ou pela falência dos órgãos e sistemas que resultam na deterioração das funções corporais, levando ao comprometimento irreversível da homeostase e eventualmente ao óbito (ERKUT et al., 2004). A resposta ao estresse gerado pela iminência do óbito apresenta um componente físico muito mais intenso do que a porção psicológica, não sendo afetado pelo estado de consciência do indivíduo (ERKUT et al., 2004).

Em necropsias com potencial jurídico, denominadas necropsias médico-legais, são recomendadas investigações sistemáticas, a fim de se analisar a causa e o processo da morte de maneira objetiva e precisa, especialmente em casos de morte súbita inesperada ou com suspeita de ação criminosa (ZHU et al., 2007; FRANÇA, 2008; DE SIQUEIRA et al., 2012, 2015; LANG; LINNET, 2013; SALVAGNI et al., 2014). Além do exame necroscópico em si, há uma série de exames complementares que podem auxiliar na investigação médico-legal referente à causa de morte de um indivíduo, e as análises de marcadores bioquímicos, como as catecolaminas, podem ser úteis para a investigação das diversas respostas referentes ao estresse desencadeado pelo processo de morte (HIRVONEN; HUTTUNEN, 1996; GOLDSTEIN, 2003; WILKE et al., 2007; ZHU et al., 2007).

A ativação do hipotálamo em determinadas circunstâncias, como no medo ou na dor intensa, resulta na estimulação do sistema nervoso simpático, gerando uma descarga em massa de neurotransmissores e culminando em uma reação disseminada pelo organismo, conhecida como reação de luta ou fuga, resposta de

alarme ou resposta ao estresse (SELYE, 1956; AXELROD; REISINE, 1984; GOLDSTEIN, 2003; GUYTON; HALL, 2006).

A adrenalina (ADR) e a noradrenalina (NOR) são catecolaminas envolvidas na resposta ao estresse, sendo sintetizadas pela medula adrenal e, no caso da NOR, também pelos nervos simpáticos (ALOUSI; WEINER, 1966; WEINER, 1970; BLASCHKO; SAYERS, 1975). Na presença do estímulo dos nervos simpáticos presentes na medula adrenal, estas catecolaminas são liberadas em grande quantidade na circulação sanguínea, na proporção aproximada de 80% de ADR e 20% de NOR em humanos (BLASCHKO; SAYERS, 1975; GUYTON; HALL, 2006) e 85-90% de ADR e 10-15% de NOR em cães (BLASCHKO; SAYERS, 1975). A ADR e a NOR circulantes apresentam efeitos similares à estimulação direta pelos nervos simpáticos nos órgãos, porém, seus efeitos são muito mais prolongados, devido à sua remoção sanguínea ser mais lenta, em torno de 2 a 4 minutos (GUYTON; HALL, 2006). A NOR circulante ativa principalmente os receptores alfa nos tecidos, causando vasoconstrição, estimulação cardíaca, relaxamento intestinal e midríase, dentre outros. A ADR, por sua vez, ativa os receptores alfa e beta similarmente, causando maior estimulação cardíaca, menor vasoconstrição e maior aumento na taxa metabólica dos tecidos do que a NOR (GOLDSTEIN, 2003; GUYTON; HALL, 2006).

Os níveis plasmáticos de ADR e NOR refletem a secreção pela medula adrenal e, embora existam diversos trabalhos relacionados à quantificação plasmática de ADR e NOR em relação à causa de morte ou a demais situações de estresse em humanos ou em modelos animais (TOSO et al., 1993; HIRVONEN; HUTTUNEN, 1996; BEERDA et al., 1999; LUCOT et al., 2005; WILKE et al., 2007; ZHU et al., 2007), a obtenção de quantidades significativas de soro no sangue após a morte é dificultada pela coagulação disseminada. Na rotina de necropsia de pequenos animais, a possibilidade de coleta de sangue no pós-morte imediato é rara. Ademais, as concentrações plasmáticas de ADR e NOR no sangue são muito menores do que na medula adrenal, havendo ainda a degradação rápida das catecolaminas plasmáticas após a morte (YOSHIMOTO; IRIZAWA; KOMURA, 1993; HIRVONEN; HUTTUNEN, 1996; ZHU et al., 2007). Outra possibilidade de estudo das concentrações de catecolaminas após a morte é pela urina (TORMEY; CARNEY; FITZGERALD, 1999; LANG; LINNET, 2013), método também utilizado na detecção de feocromocitomas em pacientes vivos (GERLO; SEVENS, 1994; SAWKA

et al., 2003; SALESOV et al., 2015). Em cadáveres, porém, não é incomum a bexiga encontrar-se vazia, devido ao relaxamento da musculatura após a morte (VANRELL, 2007; FRANÇA, 2008). Ademais, Wilke e colaboradores (2007) não encontraram relação da concentração de ADR e NOR na urina de humanos com a causa de morte ou período de agonia.

Há estudos com ratos submetidos a estresse por imobilização, cujos resultados demonstram aumento na concentração de ADR e NOR na medula adrenal destes animais de acordo com o período de estresse (SANCHEZ et al., 2004). Desta forma, a análise das medulas adrenais apresenta melhor potencial para a determinação das concentrações de ADR e NOR em pequenos animais.

A detecção e quantificação de catecolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção eletroquímica (DE) é amplamente utilizada em estudos de neuroendocrinologia, com base em matrizes de naturezas diversas, como sangue, líquido e tecidos orgânicos, como cérebro ou glândulas adrenais (MULLER; UNSICKER, 1981; COOPER; WIGHTMAN; JORGENSON, 1994; HE et al., 1997; RAGGI et al., 1999; PATEL et al., 2005; GU et al., 2008). A CLAE-DE é considerada uma técnica simples, versátil, com alta sensibilidade e especificidade, mesmo em matrizes complexas (CHENG; KUO, 1995; PATEL et al., 2005).

O objetivo deste trabalho, portanto, é quantificar as concentrações de ADR e NOR na medula adrenal de cães por CLAE-DE, e avaliar as possíveis relações destes marcadores com o sexo, a idade e a causa de morte dos animais pesquisados.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Animais

Foram amostrados 46 cães submetidos à necropsia no Serviço de Patologia Animal (SPA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) entre 2013 e 2014. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da FMVZ-USP (protocolo número 2350/2011).

Para fins de comparação entre os sexos e as diferentes idades dos animais em relação à concentração de ADR e NOR na medula adrenal, os animais foram divididos por sexo, sendo 27 machos e 19 fêmeas, e também por faixa etária, sendo 11 animais com até 3 anos de idade, 13 entre 3 a 9 anos e 22 acima de 9 anos. Os animais também foram divididos de acordo com a causa de morte concluída pela necropsia.

5.2.2. Amostras

Foram colhidas à necropsia 46 adrenais direitas e 39 adrenais esquerdas de 46 cães, após descarte das glândulas com neoplasia ou autólise severa. Após a remoção do tecido adiposo adjacente, as glândulas foram alocadas em frascos individuais e armazenadas a - 80 °C até o processamento.

5.2.3. Quantificação de adrenalina e noradrenalina em medula adrenal por CLAE-DE

As medulas das adrenais amostradas foram separadas do restante da glândula a fim de se reduzir a influência do córtex e da cápsula conjuntiva na concentração das catecolaminas pesquisadas. As medulas adrenais foram pesadas individualmente em balança analítica de precisão 0,0001 g e posteriormente imersas em ácido perclórico 0,4 M (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) na quantidade de 1 ml de ácido para cada 100 mg de medula adrenal. As amostras foram homogeneizadas por sonicação com uso de caneta sonicadora e mantidas em ácido por 24 horas a 4 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 G por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtro para seringa 13 mm, com membrana em fluoreto de polivinilideno (PVDF) e poro 0,45 µm, não estéril, marca GVS® (GVS S.P.A., Bologna, Itália).

As amostras filtradas foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com detector

eletroquímico Antec Decade[®] (Antec, Zoeterwoude, Holanda) composto de degaseificador DGU 20A, bomba LC 20AD, injetor automático SIL 20AC HT com volume variável entre 1 a 100 µL, integrador CBM 20A, e forno STD 20A. As amostras foram injetadas em coluna Shim-pack[®] CLD-ODS C-18 (Shimadzu) com dimensões de 15 cm x 4,6 mm x 5 µL sob fluxo de fase móvel de 1000 µL min⁻¹. A temperatura do forno foi constante em 40 °C. A detecção foi obtida por detector eletroquímico Antec-Decade[®] com potencial de +0,8 mV. A identificação foi baseada no tempo de retenção.

A fase móvel para o CLAE utilizada foi formada por tampão citrato 0,02 M, metanol 92/8 (v/v), 0,12 nM EDTA sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico (HSA) (Sigma). O pH foi ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico (H₃PO₄) (Sigma). A fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo e desareada por 15 minutos antes de ser colocada no CLAE, circulando no sistema por 12 horas (*overnight*) para equilíbrio da coluna, que operou no fluxo de 1 ml por minuto.

Em relações aos padrões, foi utilizado como padrão interno o DHBA (3,4 dihydroxybenzylamine hydrobromide, Sigma), por ter as mesmas características físico-químicas que as catecolaminas dosadas. Para o preparo das soluções padrões das catecolaminas analisadas, foram utilizados padrões com concentrações de 1 nM tanto de noradrenalina (bitartarato de norepinefrina, Sigma), quanto de adrenalina (bitartarato de epinefrina, Sigma), ambos diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅) e estocados a - 80 °C por até dois meses. No momento da análise, os padrões foram descongelados e diluídos de 2.500 a 10.000 vezes em ácido perclórico 0,4 M. A recuperação do método para as duas catecolaminas dosadas se manteve acima de 80%.

As concentrações de adrenalina e noradrenalina em todas as análises estão representadas como micrograma de catecolamina por grama de medula adrenal.

5.2.4. Análises estatísticas

As comparações entre as adrenais direita e esquerda de um mesmo animal em relação às concentrações de ADR e NOR em medula adrenal foram realizadas através do teste de Wilcoxon pareado. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para as

comparações referentes aos sexos, enquanto as comparações referentes às faixas etárias e às diferentes causas de morte foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

As análises estatísticas foram realizadas no software analítico GraphPad Prism[®] versão 6 (San Diego, Califórnia, EUA), e apenas valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

5.3. RESULTADOS

A distribuição dos 46 cães amostrados de acordo com a causa de morte estabelecida pela necropsia está representada na tabela 10.

Tabela 10 - Distribuição dos 46 cães de acordo com a causa de morte concluída pela necropsia

| Causa de morte | Número de animais |
|---------------------------------------|-------------------|
| Insuficiência cardíaca / respiratória | 19 (41,3) |
| Eutanásia | 11 (23,9) |
| Choque hipovolêmico | 5 (10,9) |
| Choque anafilático | 4 (8,7) |
| Septicemia | 3 (6,5) |
| Intoxicação exógena | 2 (4,3) |
| Choque neurogênico | 2 (4,3) |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: o número de animais está representado pelo número absoluto seguido pela porcentagem entre parênteses.

Não houve diferença significativa entre as glândulas adrenais direita e esquerda de um mesmo animal em relação às concentrações de ADR ($p = 0,3872$) e NOR ($p = 0,1347$) na medula adrenal. Dessa forma, todas as comparações posteriores entre os grupos foram realizadas utilizando-se as médias de concentração de adrenalina ou noradrenalina entre as adrenais direita e esquerda de cada animal.

As médias de concentração de ADR e NOR na medula adrenal em relação ao sexo e à faixa etária dos animais amostrados encontram-se descritas na tabela 11 e representadas nos gráficos 7 e 8, respectivamente.

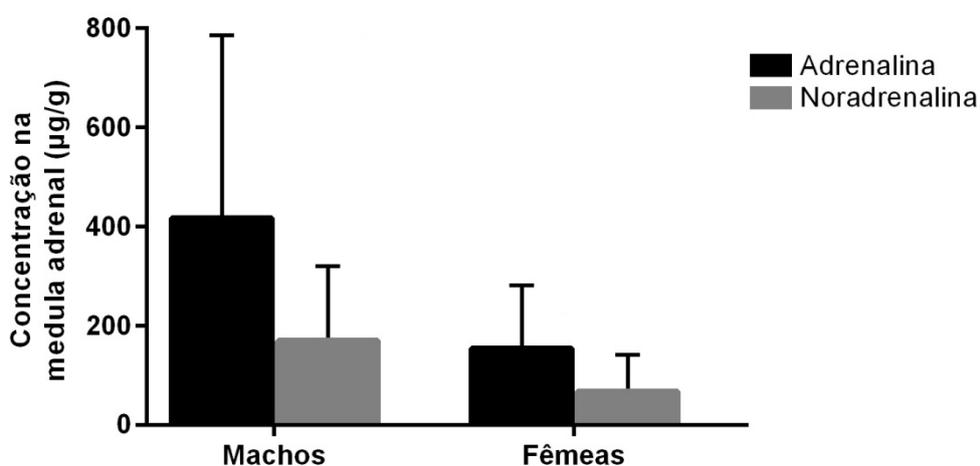
Tabela 11 - Concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com o sexo e a faixa etária dos animais

| Parâmetros | Adrenalina (µg/g) | Valor de p | Noradrenalina (µg/g) | Valor de p |
|---------------------------------|-------------------|------------|----------------------|------------|
| Sexo[†] | | | | |
| Macho | 417,7±372,4 | 0,0052* | 170,4±167,5 | 0,0130* |
| Fêmea | 155,2±127,1 | | 68,6±75,7 | |
| Faixa etária[‡] | | | | |
| ≤ 3 anos | 147,4±132,1 | 0,0539 | 63,6±60,1 | 0,1641 |
| > 3 anos e ≤ 9 anos | 468,6±450,7 | | 211,5±217,1 | |
| > 9 anos | 310,7±277,7 | | 118,3±110,1 | |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: os valores estão representados como média ± desvio padrão em microgramas de catecolamina por grama de medula adrenal. [†] Teste de Mann-Whitney. [‡] Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. * Diferença significativa entre os grupos (p<0,05).

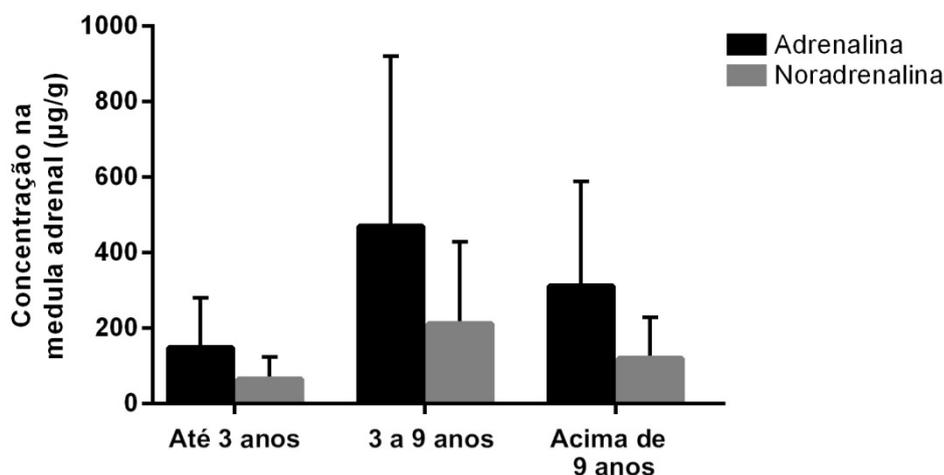
Gráfico 7 - Médias de concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com o sexo dos animais



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: As barras representam as médias de concentração de adrenalina ou noradrenalina com seus respectivos desvios-padrão. Os valores estão representados em microgramas de catecolamina por grama de medula adrenal. Teste de Mann-Whitney, com valor de p=0,0052 para as comparações referentes à adrenalina e p=0,0130 referentes à noradrenalina.

Gráfico 8 - Médias de concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com a faixa etária dos animais



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: As barras representam as médias de concentração de adrenalina ou noradrenalina com seus respectivos desvios-padrão. Os valores estão representados em microgramas de catecolamina por grama de medula adrenal. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, com valor de $p=0,0539$ para as comparações referentes à adrenalina e $p=0,1641$ para noradrenalina.

A tabela 12 e a figura 14 representam as médias de concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal em relação às diferentes causas de morte dos animais.

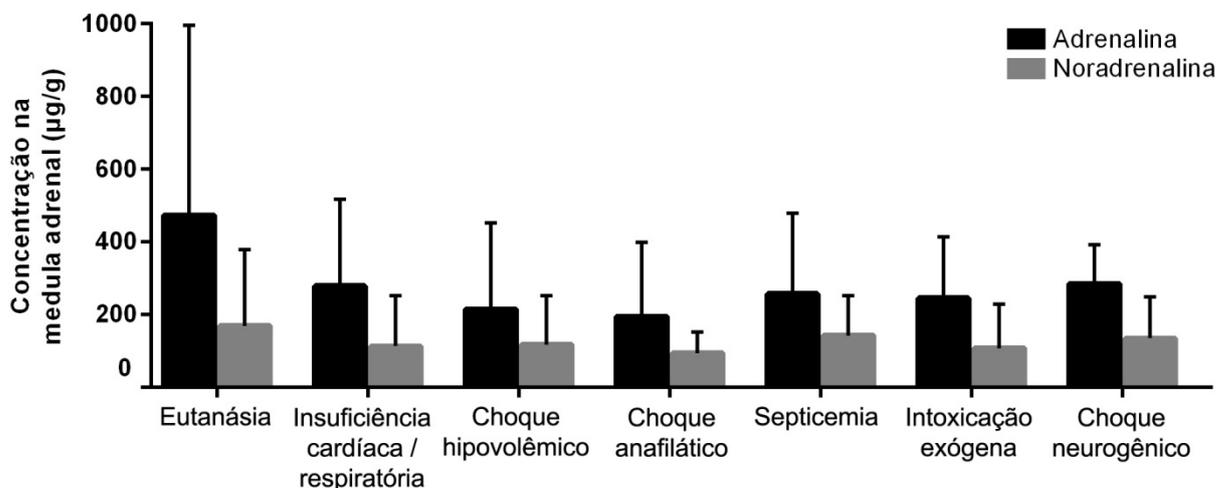
Tabela 12 - Concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com a causa de morte dos animais

| Causa de morte | Adrenalina (µg/g) | Noradrenalina (µg/g) |
|---------------------------------------|-------------------|----------------------|
| Eutanásia | 473,9±522,4 | 169,3±210,0 |
| Insuficiência cardíaca / respiratória | 279,9±238,2 | 113,7±138,2 |
| Choque hipovolêmico | 215,5±237,8 | 118,3±134,7 |
| Choque anafilático | 195,6±203,1 | 94,38±58,88 |
| Septicemia | 258,1±220,3 | 143,1±108,7 |
| Intoxicação exógena | 246,0±167,9 | 107,8±121,1 |
| Choque neurogênico | 285,6±106,9 | 135,4±113,0 |

Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Nota: os valores estão representados como média ± desvio padrão em microgramas de catecolamina por grama de medula adrenal. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para determinação do valor de p para as comparações em relação à concentração de adrenalina ($p=0,9576$) e noradrenalina ($p=0,9743$).

Gráfico 9 - Médias de concentração de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal de 46 cães submetidos à necropsia, de acordo com a causa de morte dos animais



Fonte: (SALVAGNI, F.A., 2015)

Legenda: As barras representam as médias de concentração de adrenalina ou noradrenalina com seus respectivos desvios padrão. Os valores estão representados em microgramas de catecolamina por grama de medula adrenal. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, com valor de $p=0,9576$ para as comparações referentes à adrenalina e $p=0,9743$ para noradrenalina.

5.4. DISCUSSÃO

Este estudo analisou as concentrações de ADR e NOR na medula adrenal de cães submetidos à necropsia, em relação ao sexo, faixa etária e causas de morte dos animais.

Houve diferença significativa entre os sexos em relação às concentrações de ADR e NOR nas medulas adrenais dos cães, com os machos apresentando médias de concentração de ambas as catecolaminas maiores que o dobro das médias das fêmeas. A resposta mais exacerbada dos cães machos frente a situações estressantes, sendo estas físicas ou mentais, pode ser comparada àquela encontrada na espécie humana; há estudos referentes à resposta de homens e mulheres frente às mesmas situações de estresse, nas quais os homens geralmente respondem com maiores concentrações de ADR plasmática do que as mulheres (LUNDBERG, 2005). Os níveis basais de ADR plasmática nas mulheres também costumam ser menores aos dos homens (GONZALEZ-TRAPAGA et al., 2000).

Apesar da dificuldade em se obter níveis basais de hormônios relacionados ao estresse em animais, uma vez que a própria colheita de material biológico é um estímulo estressor (BEERDA et al., 1999), são necessários estudos com níveis basais de ADR e NOR plasmáticas em cães vivos para comparação entre os sexos, a fim de se aprofundar o conhecimento em relação a esta resposta exacerbada de síntese de ADR e NOR pelas adrenais de cães machos frente ao estresse sofrido na iminência do óbito.

A maior resposta de alarme dos cães machos no período imediatamente anterior ao óbito também pode estar relacionada a um comportamento agressivo. Existem numerosos estudos relacionando a testosterona e a agressão em machos de diversas espécies (KNOL; EGBERINK-ALINK, 1989; ARCHER, 1991; MULLER; WRANGHAM, 2004; FATJO et al., 2007). Nestes trabalhos, os machos dominantes apresentam maiores níveis de testosterona do que os machos subordinados, machos castrados ou fêmeas, assim como maior expressão de comportamento agressivo. Neste estudo, 22 (81,5%) dos machos não eram castrados, o que pode estar associado à resposta exacerbada destes animais frente ao estresse na iminência do óbito.

Em relação às diferentes faixas etárias, apesar dos animais entre 3 a 9 anos de idade apresentarem mais que o triplo das médias de concentração de adrenalina e noradrenalina do grupo de animais com até 3 anos de idade, a diferença não foi estatisticamente significativa, com valor de p limítrofe (0,0539). Na faixa etária entre 3 a 9 anos de idade havia maior proporção de machos ($n=9$) em relação às fêmeas ($n=3$), enquanto os animais com até 3 anos de idade apresentaram distribuição mais homogênea entre os sexos (6 machos e 6 fêmeas). Os achados referentes às faixas etárias também podem estar relacionados à proporção do sexo dos animais em cada faixa, uma vez que os machos apresentaram concentrações maiores de ADR e NOR na medula adrenal.

Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre as diferentes causas de morte dos animais amostrados em relação às concentrações de ADR e NOR nas medulas adrenais, é possível constatar que os cães que vieram a óbito em decorrência de procedimentos de eutanásia apresentaram médias de concentração de ADR e NOR medulares numericamente maiores do que nas demais causas de morte.

A eutanásia, de acordo com a Resolução número 1000 de 12 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), é um procedimento médico que tem por objetivo a ausência ou a redução máxima de desconforto ou de dor sofridos pelo animal, além de garantir a inconsciência seguida de óbito. Dessa forma, era esperado que os animais eutanasiados apresentassem níveis menores de ADR e NOR, o que não foi observado neste estudo. Este achado pode estar relacionado ao grande desvio padrão das médias de concentração de ADR e NOR apresentado pelos cães eutanasiados, indicando a evidente variação individual entre os animais. Os cães amostrados neste estudo foram submetidos à eutanásia por motivos diversos, incluindo doenças crônicas terminais, condições agudas sem perspectiva de tratamento adequado, traumas, dentre outros. Assim, a resposta individual dos animais pode resultar na grande variação das concentrações de ADR e NOR, à semelhança do encontrado por Zhu et al. (2007), em um estudo com níveis de catecolaminas plasmáticas em humanos após a morte. Apesar de terem sido observados níveis maiores de ADR e NOR em situações de trauma, asfixia e intoxicações no estudo citado, os autores sugerem que a resposta individual ao estresse físico gerado pelas diferentes causas de morte apresentaria grande influência sobre os níveis de catecolaminas (ZHU et al., 2007). O mesmo estudo também identificou que o estresse mental apresenta pouca influência nos níveis de catecolaminas após a morte, uma vez que indivíduos que provavelmente estavam inconscientes, como em determinados traumas cranianos, apresentaram níveis maiores de ADR e NOR do que indivíduos que morreram em condições agonizantes, como por fogo ou afogamento (ZHU et al., 2007).

Erkut e colaboradores (2004) também encontraram respostas ao estresse na iminência do óbito semelhantes em humanos com demência e em indivíduos em plena consciência. Dessa forma, à semelhança dos estudos em humanos, os animais do presente trabalho que estavam inconscientes no período imediatamente anterior à morte, como no caso das eutanásias, apresentaram concentrações iguais ou maiores de ADR e NOR do que os animais que vieram a óbito por outras causas.

Outra explicação possível para os níveis maiores de catecolaminas nos animais eutanasiados pode estar relacionada ao fato de que cães apresentam resposta de alarme frente ao estresse induzido pelo ambiente do consultório ou hospital veterinário, exibindo aumento na frequência cardíaca e nos níveis de cortisol plasmático apenas por estarem na sala de espera (PEREGO; PROVERBIO; SPADA,

2013). Uma vez que a eutanásia é um procedimento que deve ser realizado exclusivamente por um médico veterinário em um ambiente adequado, de acordo com a resolução do CFMV, é possível que os animais apresentem níveis elevados de ADR e NOR até mesmo antes de iniciar o procedimento, somente pelo estresse gerado pelo ambiente médico-veterinário.

Wilke e colaboradores (2007) encontraram maiores níveis de ADR e NOR plasmáticos em humanos com trauma encefálico ou intoxicação exógena, em relação às demais causas de morte. No presente estudo, porém, os animais que vieram a óbito por choque neurogênico traumático ou por intoxicações exógenas não apresentaram níveis significativamente maiores de ADR e NOR em relação às outras causas de morte estudadas.

Os animais que vieram a óbito em decorrência de choque anafilático apresentaram as menores concentrações de ADR e NOR em medula adrenal. Os quatro animais deste grupo haviam participado de campanha pública de vacinação antirrábica em momentos distintos, vindo a óbito em minutos ou poucas horas após a inoculação. A anafilaxia é uma reação alérgica severa com rápida instalação e passível de causar a morte em até 5 minutos após a administração de medicamentos ou vacinas, principalmente por via parenteral (PUMPHREY, 2000; SAMPSON et al., 2005; KEMP; LOCKEY; SIMONS, 2008). A hipotensão é uma das principais consequências do choque anafilático, sendo decorrente da liberação em massa de mediadores pelos mastócitos, gerando vasodilatação sistêmica severa (SAMPSON et al., 2005; KEMP; LOCKEY; SIMONS, 2008). O tratamento para anafilaxia tem como base, portanto, a administração de ADR, a fim de se promover a vasoconstrição e elevar a pressão arterial do indivíduo (KEMP; LOCKEY; SIMONS, 2008; SIMONS; SIMONS, 2010). Os mastócitos ativados no miocárdio também levam à liberação de NOR, porém apenas nas terminações nervosas simpáticas locais (REID; SILVER; LEVI, 2007; TRIGGIANI et al., 2008). Dessa forma, os níveis de ADR e NOR na medula adrenal não parecem ser fortemente estimulados em quadros anafiláticos.

5.5. CONCLUSÃO

Com base nos achados do presente estudo, é possível concluir que as concentrações de ADR e NOR na medula adrenal são muito maiores em cães machos quando comparados às fêmeas. Apesar de não ter sido observada diferença estatística significativa entre as faixas etárias e causas de morte dos cães em relação à concentração de ADR e NOR na medula adrenal, foi possível constatar que os animais submetidos à eutanásia apresentaram níveis numericamente maiores de adrenalina e noradrenalina do que nas demais causas de morte, enquanto os cães que sofreram choque anafilático apresentaram as concentrações mais baixas de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal.

Os resultados obtidos indicam que a variação individual entre os animais em relação à resposta simpática à iminência do óbito exerce grande influência nos níveis das catecolaminas pesquisadas na medula adrenal de cães.

Dessa forma, a avaliação dos níveis de ADR e NOR na medula adrenal de cães após a morte deve ser cuidadosa, e seu uso como marcador de estresse anterior à morte é restrito, sendo necessários estudos futuros com cada causa de morte e sua relação com a variação individual de resposta ao estresse, além da inclusão de outras espécies, a fim de se aplicar a pesquisa destes parâmetros como marcadores de estresse em casos médico-legais veterinários.

6 CONCLUSÃO GERAL

A medicina veterinária legal é um campo em ampla expansão e com alta demanda de profissionais qualificados. A análise sistemática objetiva e precisa de todos os achados no período pós-morte de um animal é fundamental para a contribuição valiosa da patologia forense em casos de óbito de animais com potencial jurídico.

Na realidade da necropsia de cães, a suspeita do proprietário de que seu animal sofreu uma morte súbita e inesperada é muito maior do que a real ocorrência deste tipo de morte em cães, sendo o óbito por decorrência de complicações de doenças muito mais frequente. Este desconhecimento do proprietário em relação ao estado de saúde prévio de seu animal pode estar relacionado ao fato de que determinadas doenças crônicas podem se apresentar de maneira clinicamente silenciosa, como na insuficiência cardíaca crônica. Esta condição era uma das principais causas de morte dos cães amostrados neste estudo, sendo frequentemente associada à suspeita de morte súbita inesperada pelos proprietários dos animais. A observação pouco cuidadosa do animal e a falta de exames preventivos também podem levar ao desconhecimento do proprietário em relação ao real estado de saúde de seu animal. Sendo a doença desconhecida pelo proprietário, este pode expor o animal a situações estressantes inadvertidamente, as quais podem descompensar o sistema cardiovascular e levar ao óbito, gerando a suspeita de morte súbita.

As suspeitas de morte súbita podem envolver a suposição de crime contra animais, resultando no envolvimento policial, através da confecção de boletins de ocorrência e da instalação de uma investigação criminal, exigindo o preparo do profissional médico veterinário frente a uma situação médico-legal. Nestes casos, os exames cadavéricos devem ser objetivos, completos e precisos, incluindo a análise de todos os órgãos e tecidos, a fim de se prover todas as informações relevantes possíveis.

As glândulas adrenais, sendo órgãos responsivos ao estresse, oferecem diversas informações referentes à resposta do animal na iminência do óbito, porém, seu uso como parâmetro de resposta do organismo ao estresse frente a condições crônicas ou agudas em cães deve ser restrito e cauteloso.

As características morfométricas das adrenais dos cães apresentaram maior influência pelo peso corpóreo do animal e pela presença ou ausência de hiperplasia cortical do que pela associação com doenças crônicas ou condições agudas. Desta forma, apesar da prática da descrição das características morfométricas das adrenais e sua relação com as situações de estresse sofridas pelo animal previamente ao óbito ser comum na rotina de necropsia de animais, tal interpretação possui forte influência subjetiva. Não é recomendada, portanto, a utilização do peso ou do tamanho das adrenais dos cães como parâmetros para a caracterização de situações de estresse prévias ao óbito, devido à marcante variedade de raças e portes nesta espécie.

A análise histopatológica das adrenais forneceu informações valiosas associadas à cronicidade das condições patológicas sofridas pelo animal. Cães que vieram a óbito em decorrência de complicações de doenças crônicas exibiram fibrose em região corticomedular e focos de infiltrado inflamatório, estando tais achados ausentes nos animais com morte súbita ou doenças agudas. Os cães com doenças crônicas também apresentaram maior ocorrência de hiperplasia adrenocortical. Cães que sofriam de alterações cardíacas crônicas apresentaram alterações histopatológicas significativas mais marcantes em suas adrenais, como necrose, fibrose e depleção vacuolar cortical. Por outro lado, a congestão severa nas adrenais foi um achado mais frequente nos animais previamente saudáveis que sofreram morte súbita ou que vieram a óbito por doenças agudas.

A avaliação dos índices de proliferação celular e apoptose no córtex das adrenais através da marcação imunoistoquímica para PCNA e BAX e Bcl-2, respectivamente, não apresentou potencial relevante para o estudo dos efeitos do estresse por doenças crônicas sobre as adrenais de cães submetidos à necropsia em um serviço de patologia animal. Apesar de tais efeitos serem relatados em estudos experimentais em ratos de laboratório, a população canina amostrada neste estudo buscou uma representação mais próxima da realidade, e os marcadores supracitados não ofereceram resultados animadores para este fim. Por outro lado, a marcação imunohistoquímica por estes anticorpos foi positiva e bem definida nas glândulas adrenais dos cães, permitindo seu uso em estudos relacionados à população adrenocortical e sua relação com nódulos hiperplásicos ou neoplasias.

Também foi realizada a análise por CLAE-DE das catecolaminas adrenalina e noradrenalina na medula adrenal dos cães submetidos à necropsia com causas de

morte diversas, a fim de se avaliar sua utilização como marcador das variadas respostas referentes ao estresse desencadeado pelo processo de morte. As concentrações de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal se mostraram muito maiores em cães machos quando comparados às fêmeas. Não foi observada diferença estatística significativa entre as faixas etárias e causas de morte dos cães em relação à concentração das catecolaminas estudadas na medula adrenal, ainda que os animais submetidos à eutanásia apresentassem níveis numericamente maiores de adrenalina e noradrenalina do que nas demais causas de morte. Por outro lado, os cães que sofreram choque anafilático apresentaram as concentrações mais baixas de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal. Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a variação individual entre os animais em relação à resposta simpática na iminência do óbito exerce grande influência nos níveis das catecolaminas pesquisadas na medula adrenal de cães.

Os achados destes estudos podem auxiliar nas conclusões da necropsia, sendo especialmente relevantes em casos médico-legais, nos quais todos os achados possíveis devem ser analisados e relatados a fim de se prover um diagnóstico preciso, seguro e incontroverso.

REFERÊNCIAS

- ALOUSI, A.; WEINER, N. The regulation of norepinephrine synthesis in sympathetic nerves: effect of nerve stimulation, cocaine, and catecholamine-releasing agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 56, n. 5, p. 1491-1496, 1966.
- ARCHER, J. The influence of testosterone on human aggression. **British Journal of Psychology**, v. 82, n. 1, p. 1-28, 1991.
- ARPITA SARKAR, A.; CHATTERJEE, M.; BATABYAL, S. A postmortem study on the weight and morphology of adrenal glands in victims of suicide. **International Journal of Current Research and Review**, v. 6, n. 1, p. 21-27, 2014.
- AXELROD, J.; REISINE, T. D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 452-459, 1984.
- BAKER, D. D. Studies of the suprarenal glands of dogs. I. Comparison of the weights of suprarenal glands of mature and immature male and female dogs. **American Journal of Anatomy**, v. 60, n. 2, p. 231-252, 1937.
- BALKIN, D. E.; JANSSEN, L. A.; MERCK, M. D. The legal system: the veterinarian's role and responsibilities. In: MERCK, M. D. (Ed.). **Veterinary forensics: animal cruelty investigations**. 2. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. p. 1-16.
- BANKS, W. J. Sistema endócrino. In: BANKS, W. J. (Ed.). **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 521-545.
- BASSETT, J. R.; WEST, S. H. Vascularization of the adrenal cortex: Its possible involvement in the regulation of steroid hormone release. **Microscopy Research and Technique**, v. 36, n. 6, p. 546-557, 1997.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; BERNADINA, W.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W.; MOL, J. A. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. **Physiology and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 243-254, 1999.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 52, n. 3-4, p. 307-319, 1997.
- BENTHAM, J. **An introduction to the principles of morals and legislation**. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1907.
- BERNINI, G. P.; MORETTI, A.; VIACAVA, P.; BONADIO, A. G.; IACCONI, P.; MICCOLI, P.; SALVETTI, A. Apoptosis control and proliferation marker in human normal and neoplastic adrenocortical tissues. **British Journal of Cancer**, v. 86, n.

10, p. 1561-1565, 2002.

BLASCHKO, H.; SAYERS, G. Endocrinology: adrenal glands. In: BLASCHKO, H.; SAYERS, G.; SMITH, A. D. (Ed.). **American Physiological Society handbook of physiology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1975. p. 697-754.

BOCKSTAHLER, B. a.; HENNINGER, W.; MÜLLER, M.; MAYRHOFER, E.; PEHAM, C.; PODBREGAR, I. Influence of borderline hip dysplasia on joint kinematics of clinically sound Belgian Shepherd dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 3, p. 271-276, 2007.

BONNETT, B. N.; EGENVALL, A.; HEDHAMMAR, A.; OLSON, P. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 46, n. 3, p. 105-120, 2005.

BONNETT, B. N.; EGENVALL, A.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A. Mortality in insured Swedish dogs: rates and causes of death in various breeds. **The Veterinary Record**, v. 141, n. 2, p. 40-44, 1997.

BOZZO, A.; SOÑEZ, C. A.; MUGNAINI, M. T.; PASTORINO, I. C.; ROLANDO, A. N.; ROMANINI, M. C.; GAUNA, H. F. Chronic stress effects on the apoptotic index of the adrenal cortex of pregnant rats. **Biocell**, v. 30, n. 3, p. 439-445, 2006.

BYARD, R. W.; BOARDMAN, W. The potential role of forensic pathologists in veterinary forensic medicine. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 7, n. 3, p. 231-232, 2011.

CAPEN, C. C. Endocrine glands. In: MAXIE, M. (Ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 325-428.

CHENG, F. C.; KUO, J. S. High-performance liquid chromatographic analysis with electrochemical detection of biogenic amines using microbore columns. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 665, n. 1, p. 1-13, 1995.

CHOI, J.; KIM, H.; YOON, J. Ultrasonographic adrenal gland measurements in clinically normal small breed dogs and comparison with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 8, p. 985-989, 2011.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (Brasil). **Resolução número 1000 de 12 de maio de 2012**. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_1000.pdf>. Acesso em: 21 de out. de 2015.

COOPER, B. R.; WIGHTMAN, R. M.; JORGENSON, J. W. Quantitation of epinephrine and norepinephrine secretion from individual adrenal medullary cells by microcolumn high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 653, n. 1, p. 25-34, 1994.

- COOPER, J. E.; COOPER, M. E. Future trends in forensic veterinary medicine. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 7, n. 4, p. 210-217, 1998.
- COOPER, J. E.; COOPER, M. E. Forensic veterinary medicine: a rapidly evolving discipline. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 4, n. 2, p. 75-82, 2008.
- DAVLIN, S. L.; VONVILLE, H. M. Canine rabies vaccination and domestic dog population characteristics in the developing world: a systematic review. **Vaccine**, v. 30, n. 24, p. 3492-3502, 2012.
- DE SIQUEIRA, A.; CASSIANO, F. C.; LANDI, M. F. D. A.; MARLET, E. F.; MAIORKA, P. C. Non-accidental injuries found in necropsies of domestic cats: a review of 191 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 10, p. 723-728, 2012.
- DE SIQUEIRA, A.; SALVAGNI, F. A.; YOSHIDA, A. S.; GONÇALVES-JUNIOR, V.; CALEFI, A. S.; FUKUSHIMA, A. R.; DE SOUZA SPINOSA, H.; MAIORKA, P. C. Poisoning of cats and dogs by the carbamate pesticides aldicarb and carbofuran. **Research in Veterinary Science**, v. 102, n. 1, p. 142-149, 2015.
- DIMAIO, V. J.; DIMAIO, D. **Forensic pathology**. Boca Raton: CRC Press, 2001.
- DUMM, M. E.; LAKEN, B.; RALLI, E. P. Factors influencing adrenal weight and adrenal cholesterol in rats following stress. **The Journal of Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 517-531, 1955.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Glândulas endócrinas. In: DYCE, K.; SACKS, W.; WENSING, C. (Ed.). **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 208-214.
- ERKUT, Z. A.; KLOOKER, T.; ENDERT, E.; HUITINGA, I.; SWAAB, D. F. Stress of dying is not suppressed by high-dose morphine or by dementia. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 152-157, 2004.
- FATJO, J.; AMAT, M.; MARIOTTI, V. M.; DE LA TORRE, J. L. R.; MANTECA, X. Analysis of 1040 cases of canine aggression in a referral practice in Spain. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, v. 2, n. 5, p. 158-165, 2007.
- FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, M. C.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 223-230, 2008.
- FOGT, F.; VORTMEYER, A. O.; POREMBA, C.; MINDA, M.; HARRIS, C. A.; TOMASZEWSKI, J. E. bcl-2 expression in normal adrenal glands and in adrenal neoplasms. **Modern Pathology**, v. 11, n. 8, p. 716-720, 1998.
- FRANÇA, G. V. Tanatologia médico-legal. In: FRANÇA, G. V. (Ed.). **Medicina legal**.

8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 344-430.

GARNIER, F.; BENOIT, E.; VIRAT, M.; OCHOA, R.; DELATOUR, P. Adrenal cortical response in clinically normal dogs before and after adaptation to a housing environment. **Laboratory Animals**, v. 24, n. 1, p. 40-43, 1990.

GERDIN, J. A.; MCDONOUGH, S. P. Forensic pathology of companion animal abuse and neglect. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 994-1006, 2013.

GERLO, E. A. M.; SEVENS, C. Urinary and plasma catecholamines and urinary catecholamine metabolites in pheochromocytoma: Diagnostic value in 19 cases. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 250-256, 1994.

GOLDSTEIN, D. S. Catecholamines and stress. **Endocrine Regulations**, v. 37, n. 2, p. 69-80, 2003.

GONZALEZ-TRAPAGA, J. L.; NELESEN, R. A.; DIMSDALE, J. E.; MILLS, P. J.; KENNEDY, B.; PARMER, R. J.; ZIEGLER, M. G. Plasma epinephrine levels in hypertension and across gender and ethnicity. **Life Sciences**, v. 66, n. 24, p. 2383-2392, 2000.

GREENE, C. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, MO: Elsevier, 2006.

GREENE, C.; APPEL, M. Canine Distemper. In: GREENE, C. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, MO: Elsevier, 2006. p. 25-40.

GROOTERS, A. M.; BILLER, D.; MERRYMAN, J. Ultrasonographic parameters of normal canine adrenal glands: comparison to necropsy findings. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 36, n. 2, p. 126-130, 1995.

GU, Q.; SHI, X.; YIN, P.; GAO, P.; LU, X.; XU, G. Analysis of catecholamines and their metabolites in adrenal gland by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 609, n. 2, p. 192-200, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. O sistema nervoso autônomo e a medula adrenal. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. (Ed.). **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 748-770.

HARBUZ, M. S.; REES, R. G.; ECKLAND, D.; JESSOP, D. S.; BREWERTON, D.; LIGHTMAN, S. L. Paradoxical Responses of Hypothalamic Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) and CRF-41 Peptide and Adenohypophysial Proopiomelanocortin mRNA during Chronic Inflammatory Stress. **Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 1394-400, 1992.

HE, H.; STEIN, C. M.; CHRISTMAN, B.; WOOD, A. J. J. Determination of catecholamines in sheep plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: Comparison of deoxyepinephrine and 3,4-dihydroxybenzylamine as internal standard. **Journal of Chromatography B**:

Biomedical Applications, v. 701, n. 1, p. 115-119, 1997.

HIRVONEN, J.; HUTTUNEN, P. Postmortem changes in serum noradrenaline and adrenaline concentrations in rabbit and human cadavers. **International Journal of Legal Medicine**, v. 109, n. 3, p. 143-146, 1996.

HOCKENBERY, D. M.; OLTVAI, Z. N.; YIN, X. M.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 241-251, 1993.

HOETELMANS, R.; VAN SLOOTEN, H. J.; KEIJZER, R.; ERKELAND, S.; VAN DE VELDE, C. J.; DIERENDONCK, J. H. Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 7, n. 4, p. 384-392, 2000.

JENSEN, H. E. **Necropsy: a handbook and atlas**. Frederiksberg: Biofolia, 2011.

KEMP, S. F.; LOCKEY, R. F.; SIMONS, F. E. R. Epinephrine: the drug of choice for anaphylaxis. A statement of the world allergy organization. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 63, n. 8, p. 1061-1070, 2008.

KNOL, B. W.; EGBERINK-ALINK, S. T. Treatment of problem behaviour in dogs and cats by castration and progestagen administration: a review. **The Veterinary Quarterly**, v. 11, n. 2, p. 102-107, 1989.

KOKO, V.; DJORDJEVIAE, J.; CVIJIAE, G.; DAVIDOVIAE, V. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 24, p. 4225-4230, 2004.

KUHAJDA, F. P.; HUTCHINS, G. M. Adrenal cortico-medullary junction necrosis: a morphologic marker for hypotension. **American Heart Journal**, v. 98, n. 3, p. 294-297, 1979.

LACK, E. E. **Tumors of the adrenal glands and extraadrenal paraganglia**. Annapolis Junction: American Registry of Pathology, 2007. (Afip Atlas of Tumor Pathology Series, 4)

LANG, L. M.; LINNET, K. Postmortem urinary cortisol levels in relation to the cause of Death. **Journal of Forensic Research**, v. 04, n. 03, p. 4-7, 2013.

LEGAULT, F.; ROULEAU, J. L.; JUNEAU, C.; ROSE, C.; RAKUSAN, K. Functional and morphological characteristics of compensated and decompensated cardiac hypertrophy in dogs with chronic infrarenal aorto-caval fistulas. **Circulation Research**, v. 66, n. 3, p. 846-859, 1990.

LUCOT, J. B.; JACKSON, N.; BERNATOVA, I.; MORRIS, M. Measurement of plasma catecholamines in small samples from mice. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 52, n. 2, p. 274-277, 2005.

- LUNDBERG, U. Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 10, p. 1017-1021, 2005.
- MADEWELL, B. R. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 4, p. 334-340, 2001.
- MARCONDES, M.; CORREA, V. Expectativa de vida de cães e gatos dobrou nos últimos 30 anos. **Folha de São Paulo**, 6 de jul. de 2014.
- MARLET, E. F. **Elaboração de laudos periciais médico-veterinários: uma análise retrospectiva e prospectiva**. 2010. Universidade de São Paulo, 2010.
- MARLET, E. F.; MAIORKA, P. C. O ensino da medicina veterinária legal no Brasil. **Revista CFMV**, n. 55, p. 7-11, 2012.
- MAXIE, G. **Jubb, kennedy & palmer's pathology of domestic animals**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2007.
- MCCAW, D.; HOSKINS, J. Canine Viral Enteritis. In: GREENE, C. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, MO: Elsevier, 2006. p. 63-73.
- MCDONOUGH, S. P.; GERDIN, J.; WUENSCHMANN, a.; MCEWEN, B. J.; BROOKS, J. W. Illuminating Dark Cases: Veterinary Forensic Pathology Emerges. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 1, p. 5-6, 2014.
- MERCK, M. D.; MILLER, D. M.; MAIORKA, P. C. CSI: examination of the animal. In: MERCK, M. D. (Ed.). **Veterinary forensics: animal cruelty investigations**. 2. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. p. 37-68.
- MEURS, K. M. Myocardial diseases. In: ETTINGER, S.; FELDMAN, E. (Ed.). **Textbook of veterinary internal medicine**. 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2010. p. 1320-1328.
- MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa City: Iowa State Press, 2002.
- MICHELL, A. R. Longevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. **The Veterinary Record**, v. 145, n. 22, p. 625-9, 1999.
- MOORE, G. E.; BURKMAN, K. D.; CARTER, M. N.; PETERSON, M. R. Causes of death or reasons for euthanasia in military working dogs: 927 cases (1993-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 2, p. 209-214, 2001.
- MORANVILLE, M. P.; MIEURE, K. D.; SANTAYANA, E. M. Evaluation and management of shock States: hypovolemic, distributive, and cardiogenic shock. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 24, n. 1, p. 44-60, 2011.

- MULLER, M. N.; WRANGHAM, R. W. Dominance, aggression and testosterone in wild chimpanzees: a test of the "challenge hypothesis". **Animal Behaviour**, v. 67, n. 1, p. 113-123, 2004.
- MULLER, T. H.; UNSICKER, K. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection as a highly efficient tool for studying catecholaminergic systems. I. Quantification of noradrenaline, adrenaline and dopamine in cultured adrenal medullary cells. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 4, n. 1, p. 39-52, 1981.
- MUNRO, H. M.; THRUSFIELD, M. V. "Battered pets": non-accidental physical injuries found in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, n. 6, p. 279-290, 2001a.
- MUNRO, H. M.; THRUSFIELD, M. V. "Battered pets": features that raise suspicion of non-accidental injury. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 42, n. 5, p. 218-226, 2001b.
- MUNRO, R. Forensic necropsy. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 7, n. 4, p. 201-209, 1998.
- MUNRO, R.; MUNRO, H. M. C. Introduction. In: **Animal abuse and unlawful killing: forensic veterinary pathology**. London, UK: Saunders Elsevier, 2008. p. 1-2.
- MUNRO, R.; MUNRO, H. M. C. Some challenges in forensic veterinary pathology: A review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, n. 1, p. 57-73, 2013.
- OLSEN, T. F.; ALLEN, A. L. Causes of sudden and unexpected death in dogs: a 10-year retrospective study. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 41, n. 11, p. 873-875, 2000.
- OLSEN, T. F.; ALLEN, A. L. Causes of sudden and unexpected death in cats: A 10-year retrospective study. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 42, n. 1, p. 5-6, 2001.
- OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 609-619, 1993.
- PARRY, N. M. A. Sudden and unexpected death in small animal patients : Part 1. **Companion Animal**, v. 13, n. 8, p. 1-6, 2008a.
- PARRY, N. M. A. Investigating cases of sudden and unexpected death in small animal patients. **Companion Animal**, v. 13, n. 9, p. 1-5, 2008b.
- PATEL, B. A.; ARUNDELL, M.; PARKER, K. H.; YEOMAN, M. S.; O'HARE, D. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and**

Life Sciences, v. 818, n. 2, p. 269-276, 2005.

PATRA, S.; RATH, S.; DUTTA, B. K. Morphological Study Of Adrenal Gland In Case Of Suicidal Deaths. **Indian Journal of Applied Research**, v. 5, n. 3, p. 333-337, 2015.

PEREGO, R.; PROVERBIO, D.; SPADA, E. Increases in heart rate and serum cortisol concentrations in healthy dogs are positively correlated with an indoor waiting-room environment. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 1, p. 67-71, 2013.

PETROVIC-KOSANOVIC, D.; VELICKOVIC, K.; KOKO, V.; JASNIC, N.; CVIJIC, G.; MILOŠEVIC, M. C. Effect of acute heat stress on rat adrenal cortex: a morphological and ultrastructural study. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 4, p. 611-619, 2012.

POLITO, A.; DE LA GRANDMAISON, G. L.; MANSART, A.; LOUISET, E.; LEFEBVRE, H.; SHARSHAR, T.; ANNANE, D. Human and experimental septic shock are characterized by depletion of lipid droplets in the adrenals. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 11, p. 1852-1858, 2010.

PUMPHREY, R. S. H. Lessons for management of anaphylaxis from a study of fatal reactions. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, n. 8, p. 1144-1150, 2000.

QUAN, X.; GUO, K.; WANG, Y.; HUANG, L.; CHEN, B.; YE, Z.; LUO, Z. Mechanical compression insults induce nanoscale changes of membrane-skeleton arrangement which could cause apoptosis and necrosis in dorsal root ganglion neurons. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 78, n. 10, p. 1631-1639, 2014.

RAGGI, M. .; SABBIONI, C.; CASAMENTI, G.; GERRA, G.; CALONGHI, N.; MASOTTI, L. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 730, n. 2, p. 201-211, 1999.

RAO, R. H. Bilateral massive adrenal hemorrhage. **The Medical Clinics of North America**, v. 79, n. 1, p. 107-129, jan. 1995.

REID, A. C.; SILVER, R. B.; LEVI, R. Renin: At the heart of the mast cell. **Immunological Reviews**, v. 217, n. 1, p. 123-140, 2007.

RIEGLE, G. D. Chronic Stress Effects on Adrenocortical Responsiveness in Young and Aged Rats. **Neuroendocrinology**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 1973.

RISHER, J. F.; MINK, F. L.; STARA, J. F. The toxicologic effects of the carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. **Environmental Health Perspectives**, v. 72, p. 267-281, 1987.

ROSOL, T. J.; YARRINGTON, J. T.; LATENDRESSE, J.; CAPEN, C. C. Adrenal

gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 1, p. 41-48, 2001.

SALESOV, E.; BORETTI, F. S.; SIEBER-RUCKSTUHL, N. S.; RENTSCH, K. M.; RIOND, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; KIRCHER, P. R.; GROUZMANN, E.; REUSCH, C. E. Urinary and plasma catecholamines and metanephrines in dogs with pheochromocytoma, hypercortisolism, nonadrenal disease and in healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 597-602, 2015.

SALVAGNI, F. A.; DE SIQUEIRA, A.; MARIA, A. C. B. E.; DOS SANTOS, C. R.; RAMOS, A. T.; MAIORKA, P. C. Forensic veterinary pathology: Old dog learns a trick. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 5, n. 2, p. 37-38, 2012.

SALVAGNI, F. A.; SIQUEIRA, A.; MARIA, A. C. B. E.; MESQUITA, L. P.; MAIORKA, P. C. Patologia forense veterinária: aplicação, aspectos técnicos e relevância em casos com potencial jurídico de óbito de animais. **Revista Clínica Veterinária**, v. 19, n. 112, p. 58-72, 2014.

SAMPSON, H. A.; MUÑOZ-FURLONG, A.; BOCK, S. A.; SCHMITT, C.; BASS, R.; CHOWDHURY, B. A.; DECKER, W. W.; FURLONG, T. J.; GALLI, S. J.; GOLDEN, D. B. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 3, p. 584-591, 2005.

SANCHEZ, A.; TOLEDO-PINTO, E. A.; MENEZES, M. L.; PEREIRA, O. C. M. A simple high-performance liquid chromatography assay for on-line determination of catecholamines in adrenal gland by direct injection on an ISRP column. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 5, p. 481-5, 2004.

SÄRKIOJA, T.; HIRVONEN, J. Causes of sudden unexpected deaths in young and middle-aged persons. **Forensic Science International**, v. 24, n. 4, p. 247-261, 1984.

SAWKA, A. M.; JAESCHKE, R.; SINGH, R. J.; YOUNG, W. F. A comparison of biochemical tests for pheochromocytoma: Measurement of fractionated plasma metanephrines compared with the combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 553-558, 2003.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, v. 138, p. 32-32, 1936.

SELYE, H. **The stress of life**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1956.

SIMONS, K. J.; SIMONS, F. E. Epinephrine and its use in anaphylaxis: current issues. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, n. 4, p. 354-361, 2010.

SINCLAIR, L.; MERCK, M. D.; LOCKWOOD, R. **Forensic investigation of animal cruelty: a guide for veterinary and law enforcement professionals**. Washington:

Humane Society Press, 2006.

SMITH, G. K.; MAYHEW, P. D.; KAPATKIN, A. S.; MCKELVIE, P. J.; SHOFER, F. S.; GREGOR, T. P. Evaluation of risk factors for degenerative joint disease associated with hip dysplasia in German Shepherd Dogs, Golden Retrievers, Labrador Retrievers, and Rottweilers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 12, p. 1719-1724, 2001.

SWAIN, M. G. Fatigue in chronic disease. **Clinical Science**, v. 8, p. 1-8, 2000.

SWAIN, M. G.; MARIC, M. Defective corticotropin-releasing hormone mediated neuroendocrine and behavioral responses in cholestatic rats: implications for cholestatic liver disease-related sickness behaviors. **Hepatology**, v. 22, n. 5, p. 1560-1564, 1995.

SWAIN, M. G.; PATCHEV, V.; VERGALLA, J.; CHROUSOS, G.; JONES, E. a. Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to stress in a rat model of acute cholestasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 5, p. 1903-1908, 1993.

SZABO, S.; LIPPE, I. T. Adrenal gland: chemically induced structural and functional changes in the cortex. **Toxicologic Pathology**, v. 17, n. 2, p. 317-329, 1989.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1456-1462, 1995.

TORMEY, W. P.; CARNEY, M.; FITZGERALD, R. J. Catecholamines in urine after death. **Forensic Science International**, v. 103, n. 1, p. 67-71, 1999.

TOSO, C. F.; RODRÍGUEZ, R. R.; RENAULD, a R.; MÁRQUEZ, a G.; LINARES, L. M. Adrenocorticotrophic hormone, cortisol and catecholamine concentrations during insulin hypoglycaemia in dogs anaesthetized with thiopentone. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 40, n. 11, p. 1084-1091, 1993.

TRIGGIANI, M.; PATELLA, V.; STAIANO, R. I.; GRANATA, F.; MARONE, G. Allergy and the cardiovascular system. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 153, n. 1, p. 7-11, 2008.

ULRICH-LAI, Y. M.; FIGUEIREDO, H. F.; OSTRANDER, M. M.; CHOI, D. C.; ENGELAND, W. C.; HERMAN, J. P. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 5, p. 965-973, 2006.

VANRELL, J. P. As formas de morte. In: VANRELL, J. P. (Ed.). **Manual de medicina legal: tanatologia**. Leme: Mizuno, 2007. p. 55-70.

WARE, W. A. **Cardiovascular disease in small animal medicine**. London: Manson Publishing, 2007.

- WEINER, N. Regulation of norepinephrine synthesis. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 9, n. 1, p. 145-165, 1970.
- WHITWORTH, E. J.; KOSTI, O.; RENSHAW, D.; HINSON, J. P. Adrenal neuropeptides: Regulation and interaction with ACTH and other adrenal regulators. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 3, p. 259-267, 2003.
- WILKE, N.; JANSSE, H.; FAHRENHORST, C.; HECKER, H.; MANNS, M. P.; BRABANT, E. G.; TRÖGER, H. D.; BREITMEIER, D. Postmortem determination of concentrations of stress hormones in various body fluids-is there a dependency between adrenaline/noradrenaline quotient, cause of death and agony time? **International Journal of Legal Medicine**, v. 121, n. 5, p. 385-394, 2007.
- WILLENBERG, H. S.; BORNSTEIN, S. R.; DUMSER, T.; EHRHART-BORNSTEIN, M.; BAROCKA, A.; CHROUSOS, G. P.; SCHERBAUM, W. A. Morphological changes in adrenals from victims of suicide in relation to altered apoptosis. **Endocrine Research**, v. 24, n. 3-4, p. 963-967, 1998.
- WOLKERSDÖRFER, G. W.; BORNSTEIN, S. R. Tissue remodelling in the adrenal gland. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 163-171, 1998.
- WOLKERSDÖRFER, G. W.; EHRHART-BORNSTEIN, M.; BRAUER, S.; MARX, C.; SCHERBAUM, W. A.; BORNSTEIN, S. R. Differential Regulation of Apoptosis in the Normal Human Adrenal Gland. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 11, p. 4129-4136, 1996.
- XAVIER, F. G.; SPINOSA, H. D. S. Toxicologia dos praguicidas anticolinesterásicos: organofosforados e carbamatos. In: SPINOSA, H. D. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. (Ed.). **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008. p. 291-312.
- YANG, E.; KORSMEYER, S. J. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. **Blood**, v. 88, n. 2, p. 386-401, 1996.
- YOSHIMOTO, K.; IRIZAWA, Y.; KOMURA, S. Rapid postmortem changes of rat striatum dopamine, serotonin, and their metabolites as monitored by brain microdialysis. **Forensic Science International**, v. 60, n. 3, p. 183-188, 1993.
- YU, J.; XU, S.; WANG, W. X.; DENG, W. H.; JIN, H.; CHEN, X. Y.; CHEN, C.; SUN, H. T. Changes of inflammation and apoptosis in adrenal gland after experimental injury in rats with acute necrotizing pancreatitis. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 11-22, 2012.
- ZHU, B.-L.; ISHIKAWA, T.; MICHIEUE, T.; LI, D.-R.; ZHAO, D.; QUAN, L.; ORITANI, S.; BESSHO, Y.; MAEDA, H. Postmortem serum catecholamine levels in relation to the cause of death. **Forensic Science International**, v. 173, n. 2-3, p. 122-129, 2007.