KÁTIA DE OLIVEIRA PIMENTA GUIMARÃES

**Estudo morfológico do Sistema Nervoso Central de cães com Distrofia
Muscular do Golden Retriever (GRMD)**

São Paulo

2016

KÁTIA DE OLIVEIRA PIMENTA GUIMARÃES

**Estudo morfológico do Sistema Nervoso Central de cães com Distrofia Muscular do
Golden Retriever (GRMD)**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3266
FMVZ

Guimarães, Kátia de Oliveira Pimenta
Estudo morfológico do Sistema Nervoso Central de cães com Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD) / Kátia de Oliveira Pimenta Guimarães. -- 2016.
92 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

1. Distrofia Muscular de Duchenne. 2. Distrofia Muscular do Golden Retriever. 3. Distrofia. 4. Sistema Nervoso Central. 5. Cão. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo Morfológico do Sistema Nervoso Central de cães com Distrofia Muscular do Golden-Retriever (GMRD)", protocolado sob o CEUA nº 4331060214, sob a responsabilidade de **Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga e equipe; Kátia de Oliveira Pimenta Guimarães** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 18/06/2014.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 6 Dogs (6 males), protocol number CEUA 4331060214, under the responsibility of **Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga and team; Kátia de Oliveira Pimenta Guimarães** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 06/18/2014.

Vigência da Proposta: de **março** a **março**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Procedência: **Canil GRMD do Brasil**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos**

idade: **3-10 anos**

N: **6**

Linhagem: **Golden Retriever**

Peso: **20-30kg**

Resumo: Analisar a morfologia e a histologia do sistema nervoso central de (6) cães Golden Retriever com Distrofia Muscular (GRMD), a fim de verificar o efeito direto que a deleção ou mutação do gene distrofina pode causar no SNC.

São Paulo, 07 de janeiro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 27 de agosto de 2014
CEUA N 4331060214

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga (orientador)

Título do projeto: "Estudo Morfológico do Sistema Nervoso Central de cães com Distrofia Muscular do Golden-Retriever (GMRD)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 11/agosto/2014) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Acrescentar o título em inglês".

Comentário da CEUA: "Trata-se apenas da inclusão do título em inglês.".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 26 de agosto de 2015
CEUA N 4331060214

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga (orientador)

Título do projeto: "Estudo Morfológico do Sistema Nervoso Central de cães com Distrofia Muscular do Golden-Retriever (GMRD)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 03/julho/2015) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "A quantidade de encéfalos de cães com distrofia muscular a serem utilizados no projeto foi alterada de 3 para 5, devido a ocorrência de morte natural desses animais durante o andamento do projeto. A inclusão desses 2 animais será de extrema valia diante do aspecto comparativa deste projeto.".

Comentário da CEUA: "O número de encéfalos de cães utilizados para o estudo aumentou de 3 para 5. O aumento de 2 encéfalos ao projeto foi possível pelo fato de ter ocorrido morte natural de dois animais no decorrer do estudo, permitindo o acréscimo e aumento do poder estatístico do experimento.".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GUIMARÃES, Kátia de Oliveira Pimenta

Título: **Estudo morfológico do Sistema Nervoso Central de cães com Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD)**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais. Se não fosse por eles, por acreditarem e confiarem em mim, e sonharem minhas conquistas comigo, nada disso seria possível. Graças a Deus e a vocês...chegamos até aqui!!!

Dedico este trabalho com muito amor aos cães distróficos com quem trabalhei, principalmente à Liz que ficará marcada na minha memória e no meu coração para sempre...são seres maravilhosos, que nos ajudam, trabalham conosco, e que merecem muita dedicação e respeito!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, e mais importante, agradeço a Deus, pois nunca imaginei estar onde estou, demorei a entender os planos dEle para minha vida, mas hoje posso ver que Ele tem grandes planos para mim, exatamente onde estou, e sou muito grata a Ele por isso!

Aos meus pais, por todo esforço e dedicação, por todo apoio emocional, financeiro, por me educarem com amor, esforço, e por serem os velhinhos mais lindos da minha vida. Amo vocês, e agradeço a Deus a cada dia por ter nascido de vocês, pois vocês são os melhores e mais maravilhosos pais que eu poderia ter.

A minha linda avó Silvina, a mulher mais guerreira que conheci na vida, e nunca conhecerei alguém com tanta garra e determinação feito ela. A senhora é meu exemplo de força, garra e amor pela família! É um privilégio imenso poder conviver ao seu lado até aqui. E vamos, rumo aos 100 aninhos vó!

À minha orientadora, Patrícia Braga, muito obrigada por tudo! Por confiar esse trabalho a mim, por acreditar no meu potencial, por sempre me estimular, pelos ensinamentos e pelo carinho que sempre teve por mim. Esses dois anos não foram nada fáceis para nós, e sei que para você foi muito difícil, mas acredito que fizemos o nosso melhor nesse trabalho, e uma com a outra. Espero que possamos estar mais próximas daqui para frente, e que eu possa aproveitar muito mais tudo o que você tem para me ensinar, muito mais mesmo.

Aos meus familiares que de alguma forma participaram, e tiveram que me aturar nessa jornada, amo vocês...minhas irmãs, Issinha que me ouviu, e ouviu, e ouviu, e me abrigou na sua casa, junto com meu cunhadinho Gezinho, muito obrigada, a Érika que me ofereceu apoio sempre. Aos ibitinguenses, que me aguentaram de perto e de longe. Aos meus tios queridos, Rosana e Misaël, sempre preocupados em saber o andamento, oferecendo apoio, carinho.

Aos meus amigos, sempre preocupados em ajudar, apoiar, dar força...vocês tornam minha vida mais leve, obrigada por isso! Denize, Rafael, Gabriela, Ly, Fernando, Ju, Bruna,

Raquel, Luciana, Adriana, Renata, Bruna, e todos os demais que passaram pela minha vida, me dando suporte, ou me fazendo mais forte, muito obrigada!

À minha amiga e quem me ensinou muito quando cheguei na USP, Graciela Pignatari, obrigada por toda paciência e por todos os ensinamentos que você me passou. Obrigada pela amizade e carinho.

Aos meus amigos do LCT, Fabiele, João, Raphael, Larissa, Fernanda...principalmente a Isa, muito obrigada, você foi um apoio e tanto para mim, como amiga, colega de trabalho, me ensinou muita coisa, com muita paciência e dedicação, e Cristine que mesmo de longe atualmente, esteve sempre perto no apoio e amizade.

Às pessoas sensacionais que conheci nesses dois anos, Jéssica, Lara, Marcos, Franceliusa, Maria Angélica, Carol, Paulo, Miguel, Carla, Luciano, Adriana, vocês me animaram, me divertiram, me ajudaram e assim continuaremos!

À Martha, do ICB, sem o seu trabalho, ensinamentos, apoio, paciência e dedicação grande parte desse trabalho não seria possível...

Ao Rafael Agopian, que me levou para esse mundo que eu tanto me identifiquei...muito obrigado por ter visto em mim um futuro especial no mundo da pesquisa. Obrigada pelas orientações preciosas e pelo apoio.

À todos os funcionários e técnicos que sempre me ajudaram e me ensinaram...Paulinha, Augusto, Índio, André, Ronaldo, Rose.

À CAPES que possibilitou esses dois anos de dedicação exclusiva à pesquisa.

RESUMO

GUIMARÃES, K O P. **Estudo morfológico do Sistema Nervoso Central de cães com Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD)**. [Morphological study of the Central Nervous System of dogs with Muscular Dystrophy Golden-Retriever (GRMD)]. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Distrofia muscular de Duchenne é uma desordem neuromuscular causada pela mutação ou deleção do gene da distrofina, a qual é ligada ao cromossomo X. Estudos recentes têm demonstrado o importante papel da distrofina no SNC, sendo sua deficiência relacionada com uma variedade de anormalidades na função do SNC, como comportamento e disfunção cognitiva. Os modelos animais mais adequados para esses estudos são os que apresentam o quadro clínico mais semelhante ao da DMD encontrada em humanos, como cães Golden Retriever com distrofia muscular (GRMD). Por não haver ainda estudos a respeito do SNC de animais GRMD, o objetivo deste trabalho foi analisar a morfologia do encéfalo dos GRMD e o de animais não distróficos, através de análise macroscópica, utilizando métodos de medição e registro fotográfico, e análise microscópica, utilizando a técnica de coloração de violeta cresil modificada. Entretanto, usando a metodologia proposta, não foi possível verificar diferenças significativas no encéfalo quando comparados os animais distróficos e os não distróficos, o que está em concordância com a literatura para a DMD usando os mesmos parâmetros. Em tempo, existe uma variação individual na morfologia do encéfalo do cão, independente de serem animais do grupo de distróficos ou controles. Outras técnicas devem ser aplicadas a fim de elucidar as consequências da ausência total ou parcial da distrofina no SNC.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne. Distrofia Muscular do Golden Retriever. Distrofina. Sistema Nervoso Central. Cão.

ABSTRACT

GUIMARÃES, K O P. **Morphological study of the Central Nervous System of dogs with Muscular Dystrophy Golden-Retriever (GRMD)**. [Estudo morfológica do Sistema Nervoso Central de cães com Distrofia Muscular do Golden-Retriever (GRMD)]. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Duchenne muscular dystrophy is a neuromuscular disorder caused by the mutation or deletion of the dystrophin gene, which is linked to chromosome X. Recent studies have shown the important role of dystrophin in the CNS, and its related defect with a variety of abnormalities in the function of CNS, such as behavior and cognitive dysfunction. The most suitable animals models for these studies are those with the most similar clinical picture to DMD found in humans, as Golden Retriever dogs with muscular dystrophy (GRMD). There are no further studies on the GRMD animal CNS, and the aim of this study was to analyze the morphology of the brain of GRMD and not dystrophic animals through macroscopic analysis using measurement and photographic registration methods, and microscopic analysis using the modified cresyl violet staining technique. However, using the proposed methodology, we could not find significant differences in the brain when comparing the dystrophic animals and non-dystrophic, which is in agreement with the literature for DMD using the same parameters. In time, there is individual variation in dog brain morphology, whether they are animals of the dystrophic group or controls. Other techniques should be applied in order to elucidate the consequences of the total or partial absence of dystrophin in the CNS.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy. Golden Retriever Muscular dystrophy. Dystrophin. Central Nervous System. Dog.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem representativa dos animais utilizados nesse projeto.....	36
Figura 2 - Ilustração das áreas coletadas do encéfalo.....	37
Figura 3 – Comprimento total do encéfalo.....	38
Figura 4 – Comprimento do cérebro.....	39
Figura 5 – Comprimento do cerebelo.....	40
Figura 6 – Largura do lobo frontal.....	41
Figura 7 – Largura do lobo temporal.....	42
Figura 8 – Largura do cerebelo.....	43
Figura 9 – Macroscopia do encéfalo, vista dorsal.....	49
Figura 10 – Macroscopia do encéfalo, vista ventral.....	51
Figura 11 – Macroscopia do encéfalo, vista diagonal esquerda.....	53
Figura 12 – Macroscopia do encéfalo, vista diagonal direita.....	55
Figura 13 – Macroscopia do encéfalo, vista lateral direita.....	57
Figura 14 – Macroscopia do encéfalo, vista lateral esquerda.....	59
Figura 15 – Macroscopia do encéfalo, vista cranial.....	61
Figura 16 – Macroscopia do encéfalo, vista caudal.....	63
Figura 17 – Macroscopia do lado esquerdo do encéfalo, internamente, após incisão separando os hemisférios.....	65
Figura 18 – Microscopia de luz do lobo frontal cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)	67
Figura 19 – Microscopia de luz do lobo parietal cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)	69
Figura 20 – Microscopia de luz do lobo occipital cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)	71
Figura 21 – Microscopia de luz do lobo temporal cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)	73
Figura 22 – Microscopia de luz do lobo piriforme cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)	75
Figura 23 – Microscopia de luz do cerebelo corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)	77
Figura 24 – Microscopia de luz do cerebelo corado pela técnica de violeta cresil modificada (40x)	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição da idade dos animais GRMD no momento do óbito e do fenótipo/grau de distrofia muscular.....	45
Quadro 2 – Descrição dos animais do grupo controle considerando a raça, a idade na data do óbito e segundo a <i>causa mortis</i>	46
Quadro 3 – Medições dos animais do grupo GRMD.....	47
Quadro 4 – Medições dos animais do grupo controle.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	17
2.2	OS MODELOS ANIMAIS	20
2.3	OS CÃES COM DISTROFIA MUSCULAR DO GOLDEN RETRIEVER (GRMD)	22
2.4	O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	25
2.5	A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	28
3	JUSTIFICATIVA	34
4	OBJETIVOS	35
4.1	OBJETIVOS GERAIS	35
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5	MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1	MODELOS ANIMAIS	36
5.2	COLETA DO MATERIAL	36
5.3	ANÁLISE MACROSCÓPICA DO ENCÉFALO DE CÃES GRMD E CONTROLE	38
5.4	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	43
5.5	VIOLETA CRESIL MODIFICADA	44
5.6	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO ENCÉFALO DE CÃES GRMD E CONTROLE	44
6	RESULTADOS	45
6.1	DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS	45
6.2	MEDIÇÕES E ANÁLISES MACROSCÓPICAS	46
6.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	66
7	DISCUSSÃO	81
8	CONCLUSÃO	85
9	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é um distúrbio muscular severo em humanos que leva a uma degeneração progressiva dos músculos, geralmente com evolução fatal após o fim da terceira década de vida. A DMD é causada por mutações no gene que codifica a proteína distrofina (CYRULNIK; HINTON, 2008), a maior proteína humana, cuja função é se relacionar com proteínas do citoesqueleto celular (DRAVIAM et al., 2001) fazendo uma ponte com diferentes receptores da membrana celular (EBIHARA et al., 2000).

Com o tamanho total de 427kDa (kilodalton) e conhecida como Dp427, a distrofina apresenta isoformas distribuídas diferentemente nos tecidos, como a Dp427c nas estruturas cerebrais e Dp427p nas células de Purkinje (GALAZ-VEGA et al., 2005; DAOUD et al., 2009). Importante salientar que embora a distrofina seja encontrada em maior concentração na junção neuromuscular, a proteína foi encontrada em quantidades semelhantes no encéfalo (incluindo cérebro e córtex cerebelar) (LIDOV et al., 1990; CYRULNIK; HINTON, 2008). Além disso, existem outras isoformas da distrofina de menor tamanho encontradas no SNC; como as Dp140 com 140 kDa, e Dp71 com 71 kDa (DAOUD et al., 2006).

A ausência da distrofina durante o desenvolvimento do SNC altera a eficiência dos caminhos cérebro-cerebelares causando uma ruptura na formação das sinapses podendo consistir no mecanismo patogênico para o prejuízo mental na DMD (LIDOV et al., 1990; CYRULNIK; HINTON, 2008), sendo o maior destaque os déficits cognitivos encontrados nos pacientes (LIDOV, 1996; PILGRAM et al., 2010). Hoje sabemos que cerca de um terço dos pacientes com DMD apresentam déficit cognitivo (PILGRAM et al., 2010; LIDOV, 1996) e, portanto, a distrofina parece ter um papel fundamental no SNC. Em camundongos transgênicos que carregam a mutação no gene da distrofina, os mdx, também é relatada a deficiência cognitiva (MUNTONI; MATEDDU; SERRA, 1991). Além disso, reforçando o papel da distrofina no SNC, foi relatada uma anormalidade na distribuição e função dos receptores GABA em garotos com DMD, o que pode gerar um impacto no controle motor, na eficácia clínica de drogas e ainda causar distúrbios do sono (ANDERSON et al., 2002).

Dados os fenótipos correlacionados com mutações que prejudicam a presença e distribuição da distrofina no cérebro, é clara a necessidade de estudar a morfologia deste órgão quando afetado, visando correlacionar forma e função e gerando informações que possam auxiliar à formulação de hipóteses (ESTEVES; PRADA; CARVALHO, 2004), visto que o papel da distrofina no SNC é complexo e ainda compreendido de forma incompleta (ANDERSON; HEAD; MORLEY, 2012).

Neste projeto, visamos analisar morfologicamente, através do exame macro e microscópico, o cérebro de cães com distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD), considerados os modelos animais ideais para estudar a DMD. Estudos como o proposto neste trabalho nunca foram realizados, o que pode ser considerado um passo importante para elucidar o papel da distrofina no SNC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As doenças neuromusculares são um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas por mutações em genes que codificam proteínas do sarcolema, do sarcômero e proteínas que estão localizadas no citoplasma das células musculares (VAINZOF et al., 2008). Dentre elas e com alta morbidade, encontramos a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

2.1 A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

A DMD é uma doença recessiva com prevalência de aproximadamente 1 em 3000 meninos nascidos vivos, uma das mais altas dentre todas as doenças hereditárias (VERHAERT D et al., 2011). A DMD é causada por mutações no gene localizado na região Xp21, o maior gene humano já identificado compreendendo quase 0.1% do genoma humano inteiro (KOENIG et al., 1987) e que é responsável pela codificação da proteína distrofina (CYRULNIK; HINTON, 2008). Esta alta frequência da doença na população humana pode ser explicada pela alta taxa de mutação observada no gene da distrofina, onde aproximadamente um terço de todos os casos de DMD resultam de mutação novas e espontâneas (MOSER, 1984; KOENIG et al., 1987; BARBUJANI et al., 1990). A consequente falta da distrofina, normalmente concentrada na junção neuromuscular, provoca defeitos estruturais e de sinalização, que resultam em colapso gradual da fibra muscular. A ausência da distrofina na fibra muscular é um achado patognomônico na DMD. Com o tempo as crianças e adolescentes com DMD exibem deterioração na força e na função do músculo. O resultado desta mutação é uma doença que produz uma degeneração progressiva e por fim fatal (CYRULNIK; HINTON, 2008).

A distrofina está localizada no citoesqueleto do sarcolema dos músculos esqueléticos, onde se associa à várias proteínas transmembrânicas, como distroglicano e sarcoglicana, formando o complexo de proteínas associadas a distrofina (CPD), composto por pelo menos 10 proteínas, sendo essencial para a

manutenção da fisiologia e da estrutura normal das fibras musculares (DRAVIAM et al., 2001). Este complexo é responsável pela permeabilidade da membrana das células musculares, ajudando a proteger o sarcolema do estresse mecânico associado à contração muscular (EBIHARA et al., 2000). Qualquer problema associado a uma das proteínas do CPD leva à uma desestabilização de todo o complexo. Dessa forma, a integridade muscular depende de todas as proteínas do complexo (VAINZOF et al., 2000). Embora bem menos conhecida, a distrofina também está ausente no SNC em indivíduos afetados pela doença (CYRULNIK; HINTON, 2008). Estudos realizados com *C. elegans*, identificaram que o CPD exerce uma função não somente nas células musculares, mas também na manutenção do posicionamento dos neurônios, sendo que isto não ocorre no músculo (ZHOU, CHEN, 2011).

As mutações que ocorrem na DMD podem ocorrer tanto nos éxons quanto nos íntrons (ROBERTS et al., 1993), levando a perda da função da distrofina. Aproximadamente 60% dos pacientes DMD tem deleções de tamanho variados no gene da distrofina, 30% tem duplicações e o restante pode ter mutação pontual introduzindo códons de parada, porém, todos os tipos de mutações levam a perda (parcial ou completa) da produção da distrofina, e diminuição da estabilidade da mesma (PASSOS-BUENO et al., 1994; MCNALLY et al., 1996; PILGRAM et al., 2010). A variação da mutação não se correlaciona com nenhum fenótipo clínico particular em pacientes DMD, o que não é surpreendente, uma vez que, por definição, o diagnóstico da doença se baseia na falta da distrofina, e não na variação genética. Em vez disso, o fenótipo é influenciado primariamente pelo tamanho e localização da mutação. A deleção de qualquer um dos primeiros 20 exons e/ou exclusões que afetam mais de 25 exons demonstraram consequências mais graves (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013).

Verificou-se que pelo menos 50% dos indivíduos afetados exibem deleções facilmente detectáveis e nessas famílias a previsão de indivíduos que sofrem o risco de desenvolver pode ser realizada com precisão e rapidez. Estas supressões são detectadas com precisão através da análise de subfragmentos de cDNA. A análise de rotina de famílias em situação de risco para a DMD poderia diminuir drasticamente o custo e trabalho envolvidos, e aumentar muito a precisão dos estudos em DMD (KOENIG et al., 1987).

Os pacientes com DMD são aparentemente normais ao nascimento, e a partir dos 3 a 5 anos de idade começa a ocorrer enfraquecimento muscular e degeneração da musculatura esquelética (KOENIG et al., 1987; ANDERSON et al., 2002). O músculo se enfraquece devido a uma perda irreversível e permanente de sua função, por exemplo incapacitando o paciente de andar, resultando no uso de cadeira de rodas aproximadamente aos 10 anos de idade (KOENIG et al., 1987). Nas fases mais adiantadas da doença, os pacientes se tornam dependentes de terceiros para todas as atividades e, se não tiverem um atendimento especial, a morte ocorre em geral por volta da segunda década de vida por insuficiência cardíaca ou respiratória, já que o diafragma e o músculo cardíaco também ficam comprometidos (EMERY, 1993). Com o avanço da medicina, muitos pacientes estão alcançando uma maior sobrevida (MOURA et al., 2015), passando de uma média de 20 para 27 anos de idade.

A observação clínica dos pacientes DMD é a primeira maneira de diagnóstico, onde observa-se aumento da panturrilha (BEENAKKER et al., 2002) seguido de fraqueza muscular. Além disso, exames laboratoriais, como creatinofosfoquinase (CKP) e biópsia muscular, são essenciais para a confirmação do diagnóstico. Nesses pacientes a CKP está aumentada, além de não apresentarem a distrofina na biópsia muscular (LAING et al, 2011).

O diagnóstico clínico é confirmado com a investigação da região mutada, com a realização de exames genéticos para o gene da distrofina, tal qual PCR multiplex (CHAMBERLAIN et al, 1988), MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) ou ainda array-CGH (oligonucleotide-based array comparative genomic hybridisation) e também sequenciamento do DNA dos pacientes (LAING et al, 2011). O advento da tecnologia de microarray tem facilitado a comparação da expressão de genes em qualquer tecido, faixa etária, status ou fenótipo. Estes dados podem auxiliar os resultados dos métodos diagnósticos tradicionais utilizados, tal qual a histologia (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013). Além disso, diversas alterações no SNC dos pacientes distróficos foram observadas por tomografia computadorizada, comprovando que a doença afeta esse sistema (YOSHIOKA et al., 1980).

Ainda não há cura para a DMD, e terapias disponíveis atualmente tem utilidade limitada. Existe uma necessidade urgente de novas medidas terapêuticas (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013) que visem diminuir os danos causados pela ausência da distrofina nesses pacientes. Ainda não se sabe se a quantidade de distrofina tem relação com a determinação dos fenótipos na DMD.

Encontrar o mecanismo que protege alguns raros casos do efeito deletério da distrofina muscular ausente é de extrema importância e pode levar a novos caminhos para o tratamento. Vale salientar que é possível ter um músculo funcional mesmo com a distrofina ausente (ZATZ et al., 2014).

2.2 OS MODELOS ANIMAIS

Vários modelos animais manifestando fenótipos observados em doenças genéticas específicas foram identificados na natureza. Esses animais geralmente apresentam alterações fisiológicas observadas com frequência em pacientes humanos e podem ser utilizados como ferramentas importantes para estudos genéticos, clínicos, e histopatológicos, fornecendo informações importantes para a compreensão da patogênese destes distúrbios. Modelos animais são também muito valiosos para estratégias de testes para abordagens terapêuticas (VAINZOF et al., 2008).

É importante lembrar que animais não são seres humanos, e os resultados de estudos com animais podem orientar, mas não prever completamente o resultado dos estudos clínicos (MCGREEVY et al., 2015). Ainda assim, e mesmo com diferenças no fenótipo, genética, ou defeito molecular primário, o estudo de doenças genéticas através do uso de modelos animais continua a ser uma ferramenta importante para a elucidação do mecanismo das doenças e para tratamentos experimentais (VAINZOF et al., 2008). O valor desses animais nunca deve ser subestimado, pois neles pode-se executar testes que não são possíveis em indivíduos afetados, cruciais para a otimização de protocolos antes e durante os testes em humanos (MCGREEVY et al., 2015).

Em relação a modelos animais para as distrofias, o ideal é que sejam reproduzidas em modelos mamíferos, o que não é muito fácil devido ao alto custo e variação na complexidade individual dos animais, o que reduz a reprodutibilidade das experiências. Um dos princípios da genômica comparativa é que muito pode ser aprendido sobre o genoma humano, e consequentemente sobre doença humana de causa genética, através da comparação com o genoma de outras espécies. Mutações em homólogos a DMD de ratos, cães e gatos têm sido associados a doenças

análogas, lembrando sempre da variabilidade entre elas (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013). Modelos animais não-mamíferos das distrofias, como o peixe-zebra (CHAMBERS et al., 2001; RUBINSTEIN, 2003), o nematóide *C. elegans* (BAUMEISTER; GE, 2002), *Caenorhabditis elegans* e o artrópode *Drosophila melanogaster*, apresentam uma fisiopatologia muscular diferente dos pacientes humanos. Porém, dentre as vantagens, vemos que esses animais podem ser mantidos em grande número, são geneticamente manipuláveis com facilidade e, em especial o *C. elegans*, possuem uma simplicidade fisiológica, sendo bons modelos para reproduzir experimentos. Essas duas espécies (peixe-zebra e *C. Elegans*) expressam uma distrofina homóloga, o que levou ao uso desses modelos para a análise do gene DMD, além de estudos para descoberta de drogas (COLLINS; MORGAN, 2003).

Deficiência de distrofina em gatos resulta em distrofia hipertrófica muscular felina (DMPB), onde o músculo esquelético é submetido a ciclos repetidos de degeneração e regeneração, mas não desenvolve a fibrose debilitante que é característica na DMD. A hipertrofia muscular é a característica mais evidente nesses animais e, em último caso, pode ocorrer obstrução esofágica letal, insuficiência renal (KOHN et al., 1993; GASCHEN; BURGUNDER, 2001) e cardiomiopatia (GASCHEN et al., 1999). Por mais que o gato DMPB seja interessante por fornecer um outro exemplo de resposta específica para a espécie à deficiência de distrofina, não é um modelo muito utilizado porque combina as desvantagens práticas de ser um animal de grande porte, sensível e emotivo, com a objeção científica de ter a similaridade patológica limitada em comparação com a DMD (COLLINS; MORGAN, 2003).

O camundongo mdx é um dos modelos mais utilizados para estudos em DMD e terapia gênica e, apesar de ser um bom modelo genético e bioquímico para DMD, ter baixo custo e ser de fácil acesso, ele não é o melhor modelo para avaliação clínica e triagem terapêutica (VAINZOF et al., 2008; MCGREEVY et al., 2015), pois possui um fenótipo relativamente suave quando comparado com outros modelos animais (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013). Além disso o mdx difere grandemente no tamanho corporal em relação a uma criança com DMD, sendo preciso um aumento na escala de tamanho significativo (DUAN, 2015). Alguns pesquisadores sugerem que o porco talvez seria um melhor candidato para esta abordagem, pois tem tamanho e fisiologia semelhante aos humanos, além de

apresentar vantagens práticas sobre os demais animais por ser intensivamente produzido e geneticamente manipulável (COLLINS; MORGAN, 2003).

Os seres humanos e os cães têm sido fiéis companheiros durante milhares de anos. Hoje, os cães tem fornecido informações valiosas para a compreensão e tratamento das doenças humanas, e a frase "melhor amigo do homem" se tornou mais apropriada do que nunca (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013). O cão é um bom modelo para estudo da terapia genética na DMD, porque têm as duas condições: defeito genético e alterações musculares semelhantes. Os cães adultos têm peso corporal comparável aos meninos DMD e há uma quantidade semelhante de músculos alvo. Houve relato de um caso de um Labrador Retriever que desenvolveu a distrofia muscular, porém não foi possível determinar se a doença teve causa hereditária ou por mutação espontânea (BERGMAN et al., 2002). O cão Golden Retriever com Distrofia Muscular (GRMD) apresenta sinais clínicos de fraqueza muscular que podem ser monitorados durante os ensaios de terapia genética, o que não é possível com o camundongo mdx (HOWELL et al., 1997).

Com o avanço das pesquisas para DMD deve-se ter muita cautela ao passar do tratamento de camundongos mdx para cães GRMD quanto a interpretação dos dados, pois nunca é possível prever completamente o tratamento em pacientes DMD devido às muitas diferenças relacionadas às espécies (DUAN, 2015).

2.3 OS CÃES COM DISTROFIA MUSCULAR DO GOLDEN RETRIEVER (GRMD)

Numerosos casos esporádicos de distrofia muscular canina foram reconhecidos nas duas últimas décadas, mas a descrição original da Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD) como um modelo para a DMD foi feito em 1988 (COOPER et al., 1988; VAINZOF et al., 2008). Mesmo os cães não sendo animais de laboratório ideais por conta do custo alto para manter as colônias, por serem uma espécie não geneticamente manipulável e serem animais altamente sensíveis e emotivos (COOPER et al., 1988; COLLINS; MORGAN, 2003), os cães GRMD são um modelo animal promissor para o estudo da DMD porque mostram a maioria dos sinais encontrados na doença em humanos, exceto os sintomas respiratórios e perda de marcha (AMBROSIO et al., 2009). Os sinais clínicos na GRMD são progressivos, com

a fraqueza gradual e perda de massa muscular, desenvolvimento de contraturas e deformidades esqueléticas (VAINZOF et al., 2008). Esses animais apresentam alterações musculares semelhantes a patogênese da doença no humano, sendo um modelo muito mais fiel do que o camundongo mdx (COOPER et al., 1988).

Por ter uma grande semelhança com a fisiopatologia da DMD, os GRMD representam um recurso poderoso para o desenvolvimento de novas terapias. Esta similaridade vai ainda mais fundo do que o nível macroscópico: as sequências e as estruturas de genes e proteínas de GRMD e DMD tem uma forte semelhança entre si. Sendo assim, podemos contar com a medicina genômica personalizada como uma grande promessa para o modelo GRMD, visando a aplicação em seres humanos (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013).

Diversos grupos vem trabalhando com GRMD a fim de estudar e caracterizar esses animais na esperança de entender melhor a doença em humanos e desenvolver novas abordagens para o tratamento da distrofia muscular (HOWELL et al., 1997; AMBROSIO et al., 2009). Sugere-se que a doença tenha início ainda no útero (VALENTINE; CUMMING; COOPER, 1989). Os sinais clínicos mais importantes e características patológicas, levam a conclusão que ao nascimento os cães afetados são mais fracos e mais letárgicos do que os cães não-afetados ou portadores (HOWELL et al., 1997; AMBROSIO et al., 2009). Além disso, os cães afetados apresentam menor ganho de peso diário e um alto risco de desenvolver hipoglicemia, hipotermia e sepse (AMBROSIO et al., 2009). Os GRMD apresentam dificuldade para se alimentar desde jovens em decorrência da língua hipertrófica, resultando em dificuldade de sucção (HOWELL et al., 1997; AMBROSIO et al., 2009). Os animais afetados podem morrer dentro de dias, meses ou anos, e os animais que sobrevivem, quando mais velhos, morrem por conta da degeneração do músculo cardíaco (VALENTINE; CUMMING; COOPER, 1989), além da degeneração de outros músculos que podem causar insuficiência cardíaca ou respiratória (VALENTINE; CUMMING; COOPER, 1989; NGUYEN et al., 2002; COLLINS; MORGAN, 2003).

Com base nessas informações e na observação desses animais desde o seu nascimento os cães podem ser classificados em três grupos de acordo com o fenótipo e grau da doença: Fenótipo leve ou grau I, quando os animais apresentam menores complicações musculares e esqueléticas, alterações gastrointestinais de baixo grau, com melhor tolerância a exercícios; Fenótipo moderado ou grau II, apresentando sinais clínicos mais graves quando comparados ao grau I, alterações nos membros

posteriores, regurgitação mais frequente, ocorrendo de dois a dez episódios por dia e consequentemente causando desidratação, além de hérnia hiatal em uma pequena porcentagem dos casos; Fenótipo grave ou grau III, onde foram vistas alterações musculoesqueléticas mais importantes, hipertrofia de língua e megaesôfago, mais de dez episódios de regurgitação por dia e hérnia hiatal chegando a cavidade torácica em quase metade dos casos (AMBROSIO et al., 2009). A hipertrofia dos músculos pode ter relevância clínica, pois o desequilíbrio entre músculos agonistas e antagonistas afetados pode contribuir para contraturas (KORNEGAY et al., 2012).

As alterações histológicas encontradas no músculo dos GRMD são necrose e calcificação, com a regeneração das fibras musculares (HOWELL et al., 1997). O relato de um cão GRMD que apresentava ausência total da distrofina no músculo, e ainda assim tinha um fenótipo leve nos leva a pensar que é possível ter um músculo funcional em um animal de médio-grande porte mesmo na ausência da distrofina, o que traz esperança para pacientes com Duchenne (ZATZ et al., 2015).

Estudos demonstraram que é possível a utilização de biomarcadores não-invasivos nos GRMD, nas fases iniciais da doença, possibilitando a separação desses animais em grupos de acordo com a progressão da doença (lenta ou rápida), e estes biomarcadores são sensíveis, específicos, confiáveis, fáceis e rápidos de se usar, sendo muito útil para o início de tratamentos em potencial (BARTHÉLÉMY et al., 2014).

Muitos métodos de tratamento promissores tem sido desenvolvidos com a utilização de modelos animais, pois fornecem analogia com a doença sem comprometer o bem-estar de crianças portadoras de DMD (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013). A utilização de cães GRMD em ensaios pré-clínicos deve ser realizada com cuidado. A existência de diferentes fenótipos pode ser responsável por diferentes respostas às drogas e tratamentos. Portanto, a evolução clínica de ensaios terapêuticos com cães GRMD devem ser interpretados com cautela (AMBROSIO et al., 2009).

2.4 O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A ciência morfológica está intimamente ligada à forma e função de um órgão, e relacionando tudo isso podemos chegar a hipóteses que nos auxiliem a desvendar dúvidas e mistérios. Pensando nisso, diversos estudos tem sido realizados sobre a forma, dimensão, volume e diversos aspectos do cérebro (ESTEVES; PRADA; CARVALHO, 2004).

Embriologicamente, o SNC se desenvolve a partir do ectoderma, que forma o tubo neural (LORENZ, KORNEGAY, 2006), origem do SNC. Em neonatos os circuitos neurais contêm numerosas sinapses que, inicialmente, tem funcionamento imaturo. Durante o período pós-natal, sinapses desnecessárias são eliminadas, enquanto sinapses funcionalmente importantes ficam mais fortes e maduras. (HASHIMOTO; KANO, 2013).

O sistema nervoso é um grupo complexo de órgãos formado pelo tecido nervoso, tecido conjuntivo e pelos componentes vasculares, e pode ser dividido em duas subdivisões anatômicas: o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP) (BANKS, 1992).

O SNC é formado pelo cérebro, por suas extensões e pela medula espinhal, onde encontramos um tecido de sustentação mole, mas densamente homogêneo chamado neuroglia que constitui a maior parte desses órgãos e forma uma matriz onde estão incrustados os corpos das células nervosas e as fibras dendríticas e axonais. O SNP inclui os troncos nervosos (nervos craniais e espinhais), os aglomerados de corpos celulares de neurônios periféricos e as terminações nervosas, que recebem estímulos e os traduzem para informações úteis, na forma de potenciais de ação, transmitindo estas informações para o SNC (BANKS, 1992; KOESTNER; JONES, 2000; LORENZ; KORNEGAY, 2006).

O encéfalo é dividido em hemisférios cerebrais, tronco cerebral e cerebelo. São macroscopicamente identificáveis duas variedades de tecidos: a substância branca, que forma o grosso da substância situada internamente, e a substância cinzenta, que constitui a camada cortical do cérebro e cerebelo. A substância cinzenta também compõe certas “ilhas” no interior da substância branca, chamadas “núcleos”, inclusive os gânglios basais. A substância branca se compõe principalmente de fibras nervosas (axônios e dendritos) com bainhas de mielina e um mínimo de tecido de sustentação,

compreendendo oligodendróglia e astrócitos. A substância cinzenta se compõe de neuroglia (principalmente astrócitos), com numerosos corpos de células nervosas (neurônios) (BANKS, 1992; KOESTNER, JONES, 2000; LORENZ, KORNEGAY, 2006).

Funcionalmente, o SNC pode ser classificado através de um esquema simples que compreende os sistemas motor (eferente), sensorial (aferente) e autônomo (eferente e aferente). O termo eferente significa conduzir para fora de um centro e geralmente indica função motora. Aferente significa conduzir em direção a um centro e geralmente indica função sensorial (LORENZ, KORNEGAY, 2006).

As cinco principais áreas do cérebro são: O (1) telencéfalo (cérebro) – dividido em: lobo frontal, onde se encontram os neurônios responsáveis pelas funções motoras voluntárias, especialmente as respostas aprendidas ou experimentadas; lobo parietal, que funciona para a percepção consciente de toque, dor, pressão, temperatura e estímulos nocivos; lobo temporal, que trabalha para a percepção consciente de som (audição) e compartilha algumas funções com o lobo parietal; e lobo occipital, onde se localizam os centros da visão. Ainda no telencéfalo estão presentes três tipos de axônios (fibras) dos neurônios corticais: fibras de associação, que são axônios que se comunicam com outros neurônios no mesmo hemisfério cerebral; fibras de projeção, que são axônios que deixam o cérebro pela cápsula interna para entrar no tronco cerebral; e fibras comissurais, que são axônios que cruzam de um hemisfério cerebral para outro. O (2) diencefalo compreende o tálamo, que contém os núcleos que recebem informação sensorial a partir de muitas áreas, e o hipotálamo, que possui funções neuroendócrinas e autônomas, e se conecta a hipófise, além de alojar os tratos ópticos. O (3) mesencéfalo contém os neurônios para os nervos cranianos oculomotor e troclear e está associado aos reflexos visual e auditivo e retransmite informações ao cerebelo; estão presentes também os centros para reflexos pupilares à luz e os centros para controle motor (núcleos rubro/vermelho). O (4) metencéfalo compreende a ponte e o cerebelo, onde a ponte contém as vias motoras do cérebro que faz sinapse no cerebelo, que coordena a atividade motora, ajudando a regular o tônus muscular. O (5) mielencéfalo (medula oblonga) contém os componentes centrais do sistema vestibular (LORENZ, KORNEGAY, 2006).

A medula espinhal compreende a substância branca periférica composta pelos tratos nervosos que são organizados em vias motoras específica (eferente) e sensorial (aferente). A substância cinzenta está localizada no centro e é composta de

interneurônios e neurônios motores que inervam o músculo (LORENZ, KORNEGAY, 2006).

Estruturalmente, o cerebelo é uma das mais elegantes regiões do cérebro. Embora seu nome derive do latim significando pequeno cérebro, essa 'pequena' estrutura contém um número impressionante de neurônios. O número total de células do córtex cerebelar é 4 vezes superior ao número de células no córtex cerebral (ANDERSEN, KORBO, PAKKENBERG, 1992). Ele funciona como coordenador dos movimentos, além de ajudar a manter o equilíbrio, a postura, o suporte do corpo contra a gravidade e os movimentos oculares. Ele recebe informação sensorial e compara ou mede onde as partes do corpo estão em relação à ação necessária para realizar os movimentos coordenados. O cerebelo está dividido em substância cinzenta e substância branca; sua substância branca está revestida por uma camada delgada de substância cinzenta (BANKS, 1992; LORENZ; KORNEGAY, 2006) onde são evidenciadas três zonas diferentes: a camada molecular externa, a camada central das células de Purkinje e a camada granular profunda (BANKS, 1992; LORENZ; KORNEGAY, 2006; CYRULNIK; HINTON, 2008). Ele contém as vias eferente e aferente, que entram ou deixam o cerebelo através de três pares de pedúnculos que conectam o tronco cerebral ao cerebelo. Para o cerebelo funcionar, ele deve receber informação sensorial relacionada à posição da cabeça, do tronco e dos membros. As vias sensoriais mais importantes são os tratos espinocerebelares (propriocepção geral dos membros, do tronco e do pescoço), os tratos vestibulocerebelares (propriocepção especial para a posição da cabeça) e a sensação visual e auditiva através dos processos coliculares e tectocerebelares. Os axônios de todas as áreas do córtex cerebral projetam fibras ao cerebelo através do núcleo pontino. Finalmente, o cerebelo recebe a informação motora do núcleo vermelho (mesencéfalo) e da formação reticular (BANKS, 1992; LORENZ; KORNEGAY, 2006) e desempenha as funções de aprendizagem motora e cognitiva (CYRULNIK; HINTON, 2008).

Através de estudos recentes de imagem funcional, sugere-se que o cerebelo pode estar envolvido em atividades diferentes das funções de controle motor; foi visto que o cerebelo participa de tarefas cognitivas e em memórias de curto prazo. Vários pesquisadores têm argumentado que o papel do cerebelo não se limita à coordenação motora de informações, mas que se estende para a coordenação de certos tipos de informações cognitivas (GLICKSTEIN, 2006). Nas tarefas de produção e percepção é

necessária a realização das funções de temporização, e isto também é função do cerebelo (IVRY; KEELE, 1989).

No cerebelo a distrofina está presente tanto no vermis cerebelar como no cerebelo lateral, sendo restrita às membranas dos neurônios de Purkinje (SNOW; FRY; ANDERSON, 2013).

2.5 A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O grande problema clínico na DMD é a patologia do músculo esquelético, e isto compreensivelmente vem recebendo a maior atenção. Há pouca investigação a respeito do papel da distrofina no SNC na DMD, o que é importante considerando as implicações dessa interrupção e a relevância clínica relacionada (ANDERSON et al., 2002). Cerca de um terço dos pacientes com DMD possuem déficit cognitivo (PILGRAM et al., 2010; LIDOV, 1996), o que pode inferir que a falta da distrofina provavelmente leva a alterações significativas no cérebro, impactando na função cerebral (CYRULNIK; HINTON, 2008). Esse achado também é observado em animais, como relatado pela primeira vez em camundongos mdx onde, apesar da evidência não ser tão forte como em pacientes com DMD, a mutação no comprimento total da proteína distrofina no camundongo parece estar correlacionada com o grau de prejuízo cognitivo (MUNTONI; MATEDDU; SERRA, 1991). Em humanos, estudos comportamentais mostraram que meninos com DMD podem ter déficit cognitivo e QI abaixo da média, enquanto que os camundongos mdx exibem uma diminuição na memória em curto prazo (ANDERSON et al., 2002). Tentando entender o declínio na função cognitiva em pacientes com DMD um grupo de pesquisadores mediu os níveis de $A\beta_{42}$, que tem sido associado com mudanças na memória e alteração na função cognitiva, verificando presença de células progenitoras neurais no sangue circulante e do Fator de Crescimento Neural (NGF), mostrando que havia um aumento significativo desses itens, sugerindo que o $A\beta_{42}$ possa ser a causa de danos cerebrais e que o aumento dos demais fatores pode indicar que a regeneração é um processo contínuo nesses pacientes (SALAM et al., 2014).

A distrofina está presente em neurônios do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo colocalizados com receptores GABA (LIDOV; BYERS; KUNKEL, 1993;

KNUESEL et al., 1999) nas densidades pós sinápticas (KNUESEL et al., 1999; SNOW; ANDERSON; JAKOBSON, 2013), sendo as duas regiões mais ricas em distrofina o córtex cerebral e cerebelar. Necropsias realizadas em pacientes com DMD verificaram que a presença da distrofina é mais escassa nas densidades pós-sinápticas do córtex cerebral (KIM; WU; BLACK, 1995), além da ausência completa da distrofina nos neurônios cerebrais e cerebelares (UCHINO et al., 1994). A localização da distrofina nas densidades dos neurônios pós-sinápticos, sugere que esta proteína esteja envolvida no funcionamento sináptico, desempenhando um papel crucial para a plasticidade sináptica (LIDOV et al., 1990; GÓRECKI et al., 1998; VAILLEND; UNGERER; BILLARD, 1999; CYRULNIK; HINTON, 2008; MINCIACCHI et al., 2010). Um estudo recente utilizando a técnica de modelagem de doenças através de células-tronco dos pacientes com DMD demonstrou uma redução no número de sinapses dos neurônios quando comparados com neurônios que expressavam a distrofina, principalmente pós-sináptica, reforçando os achados anteriores com tecido cerebral (FERNANDES, 2015).

As células que apresentam a distrofina são os neurônios no córtex cerebral e cerebelar e dentre essas localizações estão as regiões piramidais e provavelmente neurônios estrelados, mas não em células granulares do hipocampo, e ainda nas células de Purkinje, mas não em quaisquer outros neurônios do córtex cerebelar. A distrofina dos neurônios ocorre como puncta na membrana, associada a agregados do corpo celular e dendritos, mas não axônios. A distrofina não é demonstrada em ambos, astrócitos ou oligodendrócitos (LIDOV; BYERS; KUNKEL, 1993). As distrofinas cerebrais localizadas na densidade pós-sináptica possuem três isoformas e, possivelmente, as anormalidades cognitivas relatadas são atribuíveis ao déficit dessas moléculas no cérebro associada a disfunção sináptica (KIM et al., 1992).

A isoforma da distrofina denominada Dp71, que também é conhecida como Apodistrofina-1, é o produto do gene da distrofina mais abundante no cérebro adulto (LEDERFEIN et al., 1992; JUNG et al., 1993; DAOUD et al., 2009). Pacientes com mutações localizadas na Dp71 apresentaram déficit cognitivo severo, o que foi relacionado com a falta da Dp71 no SNC. A Dp71 está associada ao desempenho no papel na sinapse glutamatérgica, na organização e no funcionamento em várias células do cérebro (DAOUD et al., 2009) e ainda, em alterações cerebrais, como desordem na arquitetura, perda neuronal, gliose, entre outras (ANDERSON et al., 2002), o que a relaciona com este déficit. Embora existam numerosas áreas do

cérebro que são tradicionalmente implicadas nestes tipos de déficits (e que podem também desempenhar um papel na DMD), a hipótese de que as vias cerebro-cerebelares tem um papel nos efeitos cognitivos associados com a doença é consistente com as opiniões de que o desenvolvimento cognitivo e motor estão intimamente relacionados (DIAMOND, 2000). Estudando a expressão da Dp71 no desenvolvimento embrionário utilizando extrato do cérebro de camundongos verificou-se que a mesma é expressada em um nível baixo no cérebro de embriões recém-nascidos até 18 dias de vida, e que este nível aumenta gradualmente depois disso. Sabe-se que a sinaptogênese ocorre 10 a 15 dias após o nascimento, indicando que a produção do gene DMD poderia desempenhar um papel na maturação do cérebro (JUNG et al., 1993).

Evidências mostram que a DMD é uma doença cerebelar, sugerindo que a interrupção das vias cerebro-cerebelares é a melhor consideração para explicar o perfil de déficits cognitivos observados em crianças com DMD, como por exemplo, extensão verbal limitada, dificuldades com o processamento fonológico, dificuldades em testes que necessitem de atenção, e problemas para leitura. Foi visto ainda que o cerebelo serve para coordenar a cognição da mesma forma que opera para coordenar as habilidades motoras e de aprendizagem, ajudando a automatizar e otimizar o desempenho em determinados domínios cognitivos. Assim, os danos no cerebelo provavelmente resultarão num desempenho abaixo do ideal e estes decréscimos no desempenho podem escapar da detecção se não forem cuidadosamente estudados (CYRULNIK; HINTON, 2008). Além disso, há evidências de que haja problemas psicossociais e comportamentais, incluindo depressão e dificuldades com interações sociais, e ainda transtornos neuropsiquiátricos. Todas essas alterações neuropsicológicas e neurocomportamentais não tem padrão nos pacientes DMD, devendo ser consideradas no desenvolvimento de intervenções terapêuticas (SNOW; ANDERSON; JAKOBSON, 2013). Sugere-se ainda que a distrofina está associada com a membrana da célula de Purkinje do cerebelo e não com elementos aferentes ou pré-sinápticos (LIDOV; BYERS; KUNKEL, 1993). As células de Purkinje que carecem de distrofina tem uma redução substancial a longo prazo, o que pode ter amplas consequências em matéria de aprendizagem. Conexões desordenadas podem resultar na transmissão ineficiente de sinalização e de informações, especialmente no domínio da linguagem. Como a célula de Purkinje é o neurônio primário de saída, anomalias de desenvolvimento na estrutura da célula de Purkinje

irão provavelmente resultar em perturbações generalizadas na eficiência de sinalização (CYRULNIK; HINTON, 2008). Em tempo, o cerebelo está envolvido na geração de movimentos coordenados finos e um defeito nessa estrutura pode esperar que cause ataxia ou tremor. De fato, nos camundongos mdx mais velhos (12 meses), tremores e leve descoordenação são vistos, o que não é característico na DMD em humanos. Verificou-se que a perda da distrofina ocorre principalmente no cerebelo lateral (SNOW; FRY; ANDERSON, 2013).

Em garotos com DMD há uma anormalidade na distribuição e função dos receptores GABA_A e isto pode ter impacto clínico em pelo menos três áreas: eficácia clínica das drogas, distúrbios do sono e controle motor. Essa interrupção pode, em parte, explicar os distúrbios do sono sofridos por eles. Muitas substâncias amplamente utilizadas em medicina clínica exercem sua influência exclusivamente ou em parte ligando-se ao receptor GABA_A. Agora é razoavelmente bem estabelecido que substâncias como os barbitúricos, benzodiazepínicos, anestésicos e corticosteróides interagem com receptores GABA_A no SNC. Em tempo, há o papel do cerebelo no controle do sistema motor, que tem demonstrado desempenhar um papel importante em tarefas de automação e aprendizagem motora, e em funções temporárias associadas com tarefas motoras (IVRY; KEELE, 1989; ANDERSON et al., 2002). Embora esses três exemplos de possíveis relevâncias clínicas das anormalidades do receptor GABA_A sejam especulativas, elas indicam a importância potencial do entendimento da função da distrofina no SNC no manejo clínico de meninos com DMD (ANDERSON et al., 2002).

Já o córtex cerebral é a região do cérebro mais fortemente associada com a função cognitiva, e espera-se que um defeito em uma classe principal de neurônios corticais cerebrais produza defeito cognitivo. Um defeito que afete todos os neurônios ou todas as sinapses provavelmente seria devastador, por isso a localização da distrofina a apenas uma subpopulação de neurônios e de uma subclasse de sinapses está de acordo com a disfunção cognitiva moderada que caracteriza a DMD. Com base nos resultados apresentados neste estudo, juntamente com a conclusão anterior de incoordenação leve e tremores no camundongo mdx, é justificável que se pense em re-examinar as características clínicas da DMD que possam caracterizar melhor a disfunção do SNC, e tentar encontrar alterações na estrutura e função sináptica que são a base fenotípica do defeito cognitivo (LIDOV et al., 1990).

Pode ser que a deficiência da distrofina nos pacientes com DMD seja resultado de um amplo espectro de anomalias relacionadas ao desenvolvimento e amadurecimento das funções do SNC (MEHLER, 2000). A disfunção no equilíbrio excitatório-inibitório possivelmente mediado pela alteração crônica na manipulação do cálcio por estes neurônios, é uma hipótese convincente, pois agrupa as duas hipóteses principais da causa do comprometimento do SNC em pacientes com DMD, que são alteração no agrupamento dos receptores GABA e alterações na função da plasticidade sináptica (ANDERSON; HEAD; MORLEY, 2012). O aumento no limiar de estimulação magnética observado em pacientes com DMD pode ser devido a redução da excitabilidade do córtex motor, porém esses dados ainda não estão bem esclarecidos (LAZZARO et al., 1998). Os neurônios de Purkinje de camundongos mdx mostraram diminuição significativa da excitabilidade coincidindo com uma significativa hiperpolarização do potencial de membrana dessas células, afetando também as propriedades elétricas intrínsecas não-sinápticas (SNOW; ANDERSON; FRY, 2014). Se de fato a distrofina está envolvida na organização do aparelho pós-sináptico, a ausência da mesma pode ser responsável por produzir, pelo menos, sutis alterações na função sináptica, que por sua vez é um substrato plausível para o déficit cognitivo leve observado na DMD (LIDOV; BYERS; KUNKEL, 1993).

Em relação aos aspectos morfológicos do SNC de pacientes com DMD, os resultados de necropsia do cérebro e de imagens cerebrais de pacientes DMD não tem sido consistente. Um dos primeiros trabalhos de pesquisa que investigou cérebros por necropsia de 21 casos clássicos de DMD encontrou apenas um caso de cérebro com peso anormal e 2 casos onde haviam “anormalidades histológicas notáveis”, e sugeriu que a DMD não estava associada com qualquer anormalidade consistente histológica ou total do cérebro (DUBOWITZ et al., 1969). Mais tarde, alguns poucos estudos nesta área descrevem anormalidades cerebrais nos pacientes com DMD variando de leve a severo. Entre as anormalidades foram notadas perda neuronal, gliose, emaranhados neurofibrilares, perda de células de Purkinje, anormalidades dendríticas (comprimento, ramificação e intersecção), distúrbios na arquitetura, astrocitose e vacuolação perinuclear (ITOH et al., 1999). Um estudo recente realizado em 30 pacientes com DMD demonstrou redução tanto da matéria branca quanto da cinzenta de todo o cérebro (DOORENWEERD et al., 2014). Estudos imuno-histoquímicos do cérebro de ratos não distróficos demonstraram que a distrofina está localizada no córtex cerebral, no hipocampo, e no cerebelo. Por conta da localização

limitada da distrofina é de se esperar que as pesquisas anteriores com SNC não detectaram anomalias morfológicas ostensivas (LIDOV et al., 1990). Em relação às imagens, estudos iniciais utilizando a ressonância magnética em pacientes com DMD não revelaram alterações anatômicas cerebrais significativas (AL-QUDAH et al., 1990). Porém, mais tarde, através do mesmo método, foram vistas diferenças significativas nas microestruturas cerebrais entre meninos com DMD e o grupo controle (DOORENWEERD et al., 2014).

Importante ainda salientar que a DMD está associada com anormalidades metabólicas do cérebro em humanos (TRACEY et al., 1995).

A ausência da distrofina parece prejudicar a migração neuronal e o crescimento axonal, ou aumentar a morte neuronal durante a vida fetal, o que não persiste após esse período (PINTO et al., 2008). O cérebro distrofino-deficiente parece ser menos resistente a influências ambientais adversas do que os cérebros normalmente desenvolvidos (CYRULNIK; HINTON, 2008).

Diante de todas essas informações considera-se que a distrofina no cérebro tem grande importância, e que tem forte ligação com déficit cognitivo e distúrbios neuropsiquiátricos, como o autismo, esquizofrenia, e essas distúrbios podem estar presentes em pacientes DMD (FERNANDES, 2015). Muitos trabalhos focando o SNC dos pacientes distróficos visaram oferecer sugestões para clínicos, educadores e pais a fim de se atentarem a parte intelectual, cognitiva, comportamental e psicossocial com a aplicação de estratégias no manejo desse distúrbio crônico, tentando reduzir o peso da doença e melhorar a qualidade de vida nos pacientes e todas as pessoas envolvidas. A continuação dessa investigação com intuito de elucidar o papel da distrofina no cérebro em desenvolvimento e no cérebro maduro são necessários para melhorar possíveis tratamentos (SNOW; ANDERSON; JAKOBSON, 2013).

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos houve um aumento substancial em nosso entendimento sobre o papel da distrofina no SNC. Estudos utilizando modelos animais têm cada vez mais demonstrado que alterações decorrentes da ausência ou mutação da distrofina no SNC podem gerar déficit cognitivo.

O cão GRMD é sabidamente um ótimo modelo para estudos referentes à DMD. Por isso, torna-se uma importante ferramenta para estudar o papel da distrofina no SNC e o envolvimento do cérebro na DMD. Esse entendimento pode colaborar com a realização de novas abordagens terapêuticas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo analisar morfologicamente o encéfalo de cães Golden Retriever com Distrofia Muscular (GRMD), a fim de verificar se a deleção ou mutação no gene da distrofina pode causar efeitos no sistema nervoso central (SNC) desse modelo animal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo principal do trabalho foi necessário o desenvolvimento de etapas, que contaram com os seguintes desafios:

- Testar a forma de coletar o SNC dos cães GRMD e dos cães do grupo controle, após o óbito;
- Analisar macroscopicamente o encéfalo dos animais (GRMD e controle);
- Analisar microscopicamente por histologia o encéfalo dos animais (GRMD e controle), através de coloração violeta cresil modificada;
- Avaliar os aspectos morfológicos dos neurônios dos cães GRMD e controle após a coloração de violeta cresil modificada em comparação com os neurônios dos cães do grupo controle.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MODELOS ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 8 animais (Figura 1), sendo 5 cães provenientes do Canil GRMD do Brasil localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade técnica da Prof. Dra. Maria Angélica Miglino, após morte natural devido às lesões causadas pela evolução da distrofia muscular e 3 animais de raças variadas para o grupo controle doados gentilmente pelo Centro Veterinário Butantã (CVB), após morte natural por causas diversas que não envolviam o SNC.

Figura 1 – Imagem representativa dos animais utilizados nesse projeto

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: (A) Imagem representativa de um animal do grupo controle. (B) Animal 5 do grupo GRMD.

5.2 COLETA DO MATERIAL

Após o exame necroscópico o encéfalo foi coletado através de uma incisão de pele e musculatura da região cranial, seguida da abertura e remoção da calota craniana com o auxílio de serrote. Em dois animais houve a injeção de paraformaldeído (PFA) a 4% através da artéria carótida comum antes da remoção do SNC e, após a remoção, o mesmo permaneceu imerso em PFA a 4% por 24 horas. Para todos os outros animais, o encéfalo foi removido e diretamente imerso em PFA

a 4% durante 24 horas. Após as 24h, para ambos procedimentos, a solução de PFA a 4% foi trocada por uma solução de 8% de PFA. O material permaneceu nessa solução por aproximadamente 7 dias. Após o período de fixação das peças foi realizada a coleta de áreas específicas, como o lobo frontal, lobo parietal, lobo temporal, lobo occipital, lobo piriforme e cerebelo, conforme demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Ilustração das áreas coletadas do encéfalo

Fonte: PRADA, I., 2014.

Legenda: Ilustração demonstrando de quais áreas do encéfalo foram realizadas as coletas. (F) Lobo Frontal; (P) Lobo parietal; (T) Lobo Temporal; (O) Lobo Occipital; (C) Cerebelo; (Pi) Lobo Piriforme.

5.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO ENCÉFALO DE CÃES GRMD E CONTROLE

Os encéfalos de todos os animais GRMD e dos animais do grupo controle foram analisados macroscopicamente para observar a forma, peso, e volume, além de várias medidas que foram realizadas, como o comprimento total, do cérebro e do cerebelo, largura do lobo frontal, do lobo temporal e do cerebelo (Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

Figura 3 –Comprimento total do encéfalo

Fonte: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Mensuração do comprimento total que compreende o tamanho em conjunto do cérebro e cerebelo, na sua extensão longitudinal, sendo medido da porção média do lobo frontal cerebral a porção mais caudal do verme cerebelar.

Figura 4 –Comprimento do cérebro

Fonte: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Mensuração do comprimento do cérebro que compreende a extensão longitudinal do cérebro, sendo medido da porção média do lobo frontal a porção média do lobo occipital.

Figura 5 –Comprimento do cerebello

Fonte: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Mensuração do comprimento do cerebello, que compreende a extensão longitudinal do cerebello, sendo medido da porção mais cranial a porção mais caudal do verme cerebelar.

Figura 6 – Largura do lobo frontal

Fonte: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Mensuração da largura do lobo frontal, que vai da porção média do lobo frontal direito a porção média do lobo frontal esquerdo.

Figura 7 –Largura do lobo temporal

Fonte: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Mensuração da largura do lobo temporal, que vai da porção média do lobo temporal direito a porção média do lobo temporal esquerdo.

Figura 8 –Largura do cerebelo

Fonte: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Mensuração cerebelo, que vai da porção média do lobo lateral cerebelar direito a porção média do lobo lateral cerebelar esquerdo.

Além disso, foi feita também a medida da largura do lobo occipital, que compreende a largura total do lobo occipital, medindo-se na porção média do mesmo. Todos os materiais foram fotografados para registro.

5.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Foi realizado o protocolo de desidratação com dois banhos de álcool a 95%, o primeiro durante 1 hora e 15 minutos e o segundo durante 30 minutos, três banhos de álcool absoluto, sendo uma hora no primeiro, três horas no segundo e duas horas no terceiro, seguido pela diafanização com três banhos de xilol, sendo o primeiro durante 30 minutos e os dois seguintes durante 1 hora cada, e, por fim a inclusão com três

banhos de parafina, sendo o primeiro durante 30 minutos e os dois últimos durante uma hora cada. Em seguida o material foi emblocado em parafina e cortado em micrótomo com espessura de 5mm.

O protocolo de desparafinização consistiu em três banhos de xilol aquecido em estufa com duração de 30 minutos cada, dois banhos em álcool absoluto com duração de 2 minutos cada, dois banhos em álcool 95% com duração de 2 minutos cada, um banho em álcool 85% durante 2 minutos e o último banho em álcool 70% durante 2 minutos.

5.5 VIOLETA CRESIL MODIFICADA

O protocolo da técnica de violeta cresil modificada que utilizamos consistiu em duas lavagens em água corrente, um banho no corante violeta cresil aquecido a 50°C em estufa durante 50 minutos (ESTEVES A et al., 2004), uma lavagem em álcool 90%, dois banhos em álcool 95% durante 3 minutos cada e dois banhos em álcool absoluto durante 3 minutos cada.

5.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO ENCÉFALO DE CÃES GRMD E CONTROLE

A morfologia estrutural e celular do cérebro e cerebelo foi analisada verificando possíveis alterações em cães GRMD, comparando-os com os cães do grupo controle (cães livres de quaisquer doenças que envolvam o SNC), através da análise histológica coradas com a técnica de Violeta Cresil, que foram documentadas através de registro fotográfico.

6 RESULTADOS

6.1 DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS

Todos os animais utilizados neste estudo têm idade variável uma vez que o óbito não foi provocado e sim dependente de causas naturais, sendo todos os cães adultos e com idades variando entre de 2 a 15 anos, machos ou fêmeas. As características de cada animal GRMD utilizado neste trabalho foram descritas considerando a idade e o Fenótipo/Grau da Distrofia Muscular (Quadro 1) (AMBROSIO et al., 2009).

Quadro 1 – Descrição da idade dos animais GRMD no momento do óbito e do fenótipo/grau de distrofia muscular

	GRMD 1	GRMD 2	GRMD 3	GRMD 4	GRMD 5
Idade	2 anos, 3 meses	2 anos, 4 meses	6 anos, 6 meses	8 anos, 0 meses	7 anos, 3 meses
Fenótipo/ Grau	Grave/III	Grave/III	Leve/I	Moderado/II	Moderado/II
Causa mortis	ICR	ICR	ICR	ICR	ICR

GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: (ICR) Insuficiência cardio-respiratória.

Os GRMD 1 e 2 foram classificados como pertencentes ao grupo com fenótipo grave ou Grau III da distrofia muscular, pois apresentavam alterações musculoesqueléticas bem importantes, com grande dificuldade de locomoção, disfagia acentuada, episódios de regurgitação frequentes, desidratação e hipertrofia de língua severa. O GRMD 3 foi classificado como apresentando o fenótipo leve ou Grau I, pois apresentava discretas alterações musculares e esqueléticas e ausência de regurgitação. Os GRMD 4 e 5 foram classificados dentro do grupo que apresenta o fenótipo Moderado ou Grau II, pois apresentavam alterações musculoesqueléticas

moderadas nos membros posteriores, alguns episódios de regurgitação, desidratação esporádica e disfagia (AMBROSIO et al., 2009).

Os animais do grupo controle foram descritos de acordo com a idade, raça e a *causa mortis* (Quadro 2).

Quadro 2 – Descrição dos animais do grupo controle considerando a raça, a idade na data do óbito e segundo a *causa mortis*

	Controle 1	Controle 2	Controle 3
Raça	Cocker	Pit Bull	Poodle
Idade	14 anos 0 meses	13 anos 0 meses	6 anos 0 meses
<i>Causa mortis</i>	Carcinoma	Trombo metastático	Pancreatite

GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

O animal 1 do grupo controle foi a óbito em decorrência de um Carcinoma no membro pélvico, o qual o debilitou de maneira severa. O animal 2 apresentava formações tumorais não classificadas em fígado e glândula adrenal, além de um trombo metastático na veia cava, desencadeando o óbito. O animal 3 veio a óbito por conta de peritonite consequência de pancreatite.

6.2 MEDIÇÕES E ANÁLISES MACROSCÓPICAS

Após a remoção do encéfalo dos animais, foram feitas pesagens e medições nos animais afetados pela distrofia muscular e nos animais do grupo controle, sendo os dados obtidos compilados em um quadro e posteriormente analisados por comparação (Quadro 3).

Quadro 3 – Medições dos animais do grupo GRMD

Ani mal	Comp. Total/ mm	Comp. Cérebro / mm	Comp. Cerebelo/ mm	Largura lobo frontal/ mm	Largur a lobo pariet al/ mm	Largura lobo occipita l/ mm	Largura cerebel o/ mm	Peso/ g	Volu me/ mL
1	82.11	72.41	24.88	45.27	57.40	53.81	40.73	97.73	100
2	78.06	65.61	24.05	41.92	56.01	57.71	42.53	77.60	80
3	80.58	67.86	25.00	45.28	55.77	53.11	43.25	96.73	90
4	80.00	71.47	26.32	43.80	51.90	51.98	42.51	91.25	90
5	75.12	64.33	26.54	46.03	55.11	56.60	42.67	90.15	80

Fonte: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

É importante destacar que no item “Comprimento Total” ou “Comp. Total” foi possível observar que no GRMD 5 houve uma diferença significativa em relação aos demais animais, sendo condizente com a análise visual feita através de documentação fotográfica.

Em tempo, em relação ao GRMD 2, provavelmente por causa da coleta ter sido bastante trabalhosa, houveram alguns danos na estrutura anatômica macroscópica. O animal foi mantido neste trabalho por conta das análises histológicas, porém sem que as análises macroscópicas fossem consideradas para a compilação dos resultados, pois é possível que os valores das mensurações feitas nesse material não tenham sido fidedignas.

Quadro 4 – Medições dos animais do grupo controle

Ani mal	Comp. Total/ mm	Comp. Cérebro / mm	Comp. Cereb elo/ mm	Largura lobo frontal/ mm	Largura lobo parietal/ mm	Largura lobo occipital/ mm	Largura cerebel o/ mm	Peso/ g	Volu me/ mL
1	77.40	69.03	26.52	41.18	51.58	53.21	42.99	59.87	60
2	62.86	51.79	21.90	42.09	43.25	49.82	36.41	95.82	100

Fonte: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

O encéfalo de todos os animais tiveram seus registros fotográficos, sendo possível observar e analisar a morfologia macroscópica do encéfalo dos animais

afetados pela distrofia muscular e dos animais do grupo controle (Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Figura 9 – Macroscopia do encéfalo, vista dorsal

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Macroscopia do encéfalo, vista dorsal. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Observar as sutis variações entre todas as amostras, com exceção do GRMD 5 que apresenta diferença mais marcante sendo mais achatado e largo do que os demais, conferindo um comprimento total maior.

Na vista dorsal do encéfalo é possível observar o tamanho total do encéfalo, verificando largura e comprimento, a relação de tamanho e disposição entre cérebro e cerebelo, o tecido cerebral onde visualizamos a disposição dos sulcos e giros cerebrais. Existem diferenças sutis entre todos os encéfalos, não sendo possível atribuir nenhuma característica que distinga os animais GRMD dos controles.

Figura 10 – Macroscopia do encéfalo, vista ventral

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Macroscopia do encéfalo, vista ventral. (Seta verde) Bulbo olfatório; (Seta preta) Ponte; (Seta vermelho) Bulbo; Seta amarela) Medula espinhal. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não é possível visualizar alterações marcantes entre os grupos, exceto o animal GRMD 5 onde é possível visualizar um achatamento. É possível observar que houve laceração do tecido cerebral no GRMD 2.

Na vista ventral do encéfalo visualizamos ponte, bulbo e a parte inicial da medula espinhal, além da região ventral do cérebro. O tecido cerebral do animal GRMD 2 apresenta laceração importante. Observamos que o formato do encéfalo do animal GRMD 5 é mais achatado, portanto com comprimento menor e largura maior, em relação aos outros animais. Não foram observadas características marcantes que pudessem distinguir os animais controles dos GRMD, com exceção da vista ventral do bulbo olfatório que parece mais longa que os animais controles. Entretanto, como os animais controles usados nesse trabalho não são da raça Golden Retriever, essa característica não foi levada em consideração como pertencente exclusivamente aos animais distróficos.

Figura 11 – Macroscopia do encéfalo, vista diagonal esquerda

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Macroscopia do encéfalo, vista diagonal esquerda. (Seta preta) Lobo cerebral esquerdo; (Seta vermelha) Vermis cerebelar; (Seta amarela) Medula espinhal. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não é possível visualizar alterações marcantes entre os grupos. É possível observar que houve laceração do tecido cerebral no GRMD 2.

Na vista diagonal do lado esquerdo do encéfalo visualizamos sulcos e giros do hemisfério cerebral esquerdo, vermis cerebelar, lobo cerebelar esquerdo, e início da medula espinhal. Vemos que há uma pequena laceração no cérebro do animal GRMD 2. Não foram observadas características marcantes que pudessem distinguir os animais controles dos GRMD.

Figura 12 – Macroscopia do encéfalo, vista diagonal direita

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Macroscopia do encéfalo, vista diagonal direita. (Seta preta) Lobo cerebral esquerdo; (Seta vermelha) Vermis cerebelar; (Seta amarela) Medula espinhal. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não é possível visualizar alterações marcantes entre os grupos.

Na vista diagonal do lado direito do encéfalo visualizamos sulcos e giros do hemisfério cerebral direito, vermis cerebelar, lobo cerebelar direito, e início da medula espinhal. Novamente, como nas outras vistas, não é possível identificar nenhuma variação que distinga os animais distróficos dos controles.

Figura 13 – Macroscopia do encéfalo, vista lateral direita

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Macroscopia do encéfalo, vista lateral direita. (Seta rosa) Cerebelo; (Seta verde) Tecido cerebral; (Seta amarela) Ponte; (Seta vermelha) Bulbo; (Seta preta) Medula espinhal. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não é possível visualizar alterações marcantes entre os grupos. É possível observar que houve laceração do tecido cerebral no GRMD 2.

Na visualização do hemisfério direito do encéfalo observamos o tecido cerebral com seus sulcos e giros, o tecido cerebelar e a parte lateral da ponte, o bulbo e a parte inicial da medula espinhal, visualizando a disposição e relação dessas estruturas entre si. Existem diferenças sutis entre todos os animais, não sendo possível identificar nenhuma que seja única apenas nos distróficos.

Figura 14 – Macroscopia do encéfalo, vista lateral esquerda

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Macroscopia do encéfalo, vista lateral esquerda. (Seta rosa) Cerebelo; (Seta verde) Tecido cerebral; (Seta amarela) Ponte; (Seta vermelha) Bulbo; (Seta preta) Medula espinhal. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não é possível visualizar alterações marcantes entre os grupos. É possível observar que houve laceração do tecido cerebral no GRMD 2.

Na visualização do hemisfério esquerdo do encéfalo observamos o tecido cerebral com seus sulcos e giros, o tecido cerebelar, e a parte lateral da ponte, o bulbo e a parte inicial da medula espinhal, visualizando a disposição e relação dessas estruturas entre si. É possível observar laceração no tecido cerebral e cerebelar do animal GRMD 2. Não foram observadas variações anatômicas entre os animais controles e distróficos que se destacassem.

Figura 15 – Macroscopia do encéfalo, vista cranial

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Macroscopia do encéfalo, vista cranial. (Seta preta) Bulbo olfatório. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não é possível visualizar alterações marcantes entre os grupos. É possível observar que houve pequena laceração do tecido cerebral no GRMD 2.

Na vista cranial do encéfalo observamos o tecido cerebral com seus sulcos e giros. Visualizamos laceração no tecido cerebral do animal GRMD 2. Nesta vista, foi possível observar que o bulbo olfatório nos GRMD é mais longo que nos controles. Entretanto, como os animais controles usados neste trabalho não são da mesma raça que os GRMD, ou seja, Golden Retriever, esta observação não foi considerada como relevante.

Figura 16 – Macroscopia do encéfalo, vista caudal

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Macroscopia do encéfalo, vista caudal. (Seta preta) Tecido cerebral; (Seta vermelha) Tecido cerebelar; (Seta amarela) Medula espinhal. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não é possível visualizar alterações marcantes entre os grupos, com exceção do animal 5 onde visualizamos um achatamento dorsoventral do encéfalo.

Na vista caudal do encéfalo observamos o tecido cerebral, o tecido cerebelar e a medula espinhal. O animal GRMD 5 apresentou um achatamento dorsoventral do encéfalo. Não foram observadas características marcantes que pudessem distinguir os animais controles dos GRMD.

Figura 17 – Macroscopia do lado esquerdo do encéfalo, internamente, após incisão separando os hemisférios

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Macroscopia do lado esquerdo do encéfalo, internamente, após incisão separando os hemisférios. (Seta rosa) Cerebelo; (Seta verde) Cérebro; (Seta amarela) Ponte; (Seta vermelha) Bulbo; (Seta preta) Medula espinhal. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não é possível visualizar alterações marcantes entre os grupos.

No lado esquerdo do encéfalo, internamente, visualizamos os sulcos e giros cerebrais, a parte interna do cerebelo, e a parte interna da ponte, bulbo e medula espinhal.

Nas análises macroscópicas foi possível verificar diferenças sutis, como profundidade dos giros, tamanho e disposição entre as estruturas do encéfalo, quando comparados os encéfalos dos grupos controle e GRMD. Entretanto, não foi possível relatar nenhuma alteração significativa entre os dois grupos. Além disso, mesmo dentro do próprio grupo foram observadas essas diferenças sutis. Também não foi observada nenhuma diferença quando comparados os hemisférios esquerdo e o direito, levando a concluir que não há diferenças macroscópicas no encéfalo dos GRMD com os controles.

No grupo GRMD, destacamos o animal 5 onde o cérebro, e principalmente o cerebelo, pareceram menores no seu comprimento total, o que se confirma nas medições descritas anteriormente. O cérebro desse animal pareceu ter uma forma mais ovalada, e mais achatada dorso-ventralmente. Apesar deste achado, o mesmo não foi considerado como relevante para distinguir animais distróficos, pois provavelmente se atribui a uma variação anatômica do próprio animal.

6.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Na análise histológica através da técnica de violeta cresil modificada foi possível visualizar com nitidez a morfologia dos núcleos neuronais, núcleos de células da neuroglia, e as células de Purkinje com a parte inicial de seus dendritos.

As imagens dos tecidos visualizados sob microscopia óptica após a coloração estão representadas pelos registros fotográficos nas figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24.

Figura 18 – Microscopia de luz do lobo frontal cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Imagens representativas das observações da microscopia das células da região do lobo frontal do cérebro. (Seta cheia) Núcleo de neurônio granular; (Seta vazia) Núcleo de neurônio Piramidal; (Ponta da Seta) Células da neuroglia; (Seta verde) Núcleo; (Seta vermelha) Citoplasma; (Seta amarela) Axônio. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não foram observadas alterações marcantes entre os grupos através da técnica utilizada.

Na região de córtex cerebral, tanto para os animais controles como para os distróficos, em lobo frontal, notamos a presença de células neuronais da camada granular que apresentaram núcleo volumoso, arredondado, nucléolo evidente, por vezes sendo possível a visualização do citoplasma celular; presença de células neuronais da camada piramidal, caracterizadas por seu formato em pirâmide, por vezes sendo possível a visualização de seus prolongamentos; presença de núcleos das células da neuroglia que se apresentaram de tamanho bem menor em relação as demais células.

Figura 19 - Microscopia de luz do lobo parietal cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Imagens representativas das observações da microscopia das células da região do lobo parietal do cérebro. (Seta cheia) Núcleo de neurônio granular; (Seta vazia) Núcleo de neurônio piramidal; (Ponta da Seta) Células da neuroglia. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não foram observadas alterações marcantes entre os grupos através da técnica utilizada.

Na região de córtex cerebral, em lobo parietal, notamos a presença de células neuronais da camada granular que apresentaram núcleo volumoso, arredondado, nucléolo evidente; presença de células neuronais da camada piramidal, caracterizadas por seu formato em pirâmide; presença de núcleos das células da neuroglia que se apresentaram de tamanho bem menor em relação as demais células. Não foram feitas observações que pudessem distinguir animais controles de distróficos.

Figura 20 - Microscopia de luz do lobo occipital cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Imagens representativas das observações da microscopia das células da região do lobo occipital do cérebro. (Seta cheia) Núcleo de neurônio granular; (Seta vazia) Núcleo de neurônio Piramidal; (Ponta da Seta) Células da neuroglia; (Seta verde) Núcleo; (Seta vermelha) Citoplasma; (* amarelo) Camada Molecular; (* vermelho) Camada Granular; (* verde) Camada Piramidal. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não foram observadas alterações marcantes entre os grupos através da técnica utilizada.

Na região de córtex cerebral, em lobo occipital, notamos a presença de células neuronais da camada granular que apresentaram núcleo volumoso, arredondado, nucléolo evidente, por vezes sendo possível a visualização do citoplasma celular; presença de células neuronais da camada piramidal, caracterizadas por seu formato em pirâmide; presença de núcleos das células da neuroglia que se apresentaram de tamanho bem menor em relação as demais células. Em algumas fotos foi possível observar as camadas do córtex cerebral, sendo a camada molecular a mais externa, seguida da camada granular externa e por último a camada piramidal. Nenhuma característica diferente e relevante foi observada entre animais controle e GRMD.

Figura 21 - Microscopia de luz do lobo temporal cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Imagens representativas das observações da microscopia das células da região do lobo temporal do cérebro. (Seta cheia) Núcleo de neurônio granular; (Seta vazia) Núcleo de neurônio Piramidal; (Ponta da Seta) Células da neuroglia; (Seta verde) Núcleo; (Seta vermelha) Citoplasma; (Seta amarela) Axônio. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não foram observadas alterações marcantes entre os grupos através da técnica utilizada.

Na região de córtex cerebral, em lobo temporal, notamos a presença de células neuronais da camada granular que apresentaram núcleo volumoso, arredondado, nucléolo evidente, por vezes sendo possível a visualização do citoplasma celular; presença de células neuronais da camada piramidal, caracterizadas por seu formato em pirâmide, por vezes sendo possível a visualização de seus prolongamentos; presença de núcleos das células da neuroglia que se apresentaram de tamanho bem menor em relação as demais células. Os tecidos dos animais controles e dos distróficos apresentaram muita semelhança, não sendo possível relatar diferenças relevantes entre os dois grupos.

Figura 22 - Microscopia de luz do lobo piriforme cerebral corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Imagens representativas das observações da microscopia das células da região do lobo piriforme do cérebro. (Seta cheia) Núcleo de neurônio granular; (Seta vazia) Núcleo de neurônio Piramidal; (Ponta da Seta) Células da neuroglia; (Seta verde) Núcleo; (Seta vermelha) Citoplasma; (Seta amarela) Axônio. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não foram observadas alterações marcantes entre os grupos através da técnica utilizada.

Na região de córtex cerebral, em lobo piriforme, notamos a presença de células neuronais da camada granular que apresentaram núcleo volumoso, arredondado, nucléolo evidente, por vezes sendo possível a visualização do citoplasma celular; presença de células neuronais da camada piramidal, caracterizadas por seu formato em pirâmide, por vezes sendo possível a visualização de seus prolongamentos; presença de núcleos das células da neuroglia que se apresentaram de tamanho bem menor em relação as demais células. Não foram observadas diferenças entre os dois grupos.

Figura 23 - Microscopia de luz do cerebello corado pela técnica de violeta cresil modificada (20x)

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Microscopia das células da região do cerebello. (Seta vazia) Camada molecular; (Seta cheia) Camada das células de Purkinje; (* amarelo) Camada de células granulares; (Ponta da seta) Substância branca. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não foram observadas alterações marcantes entre os grupos através da técnica utilizada.

No cerebelo notamos a substância cinzenta caracterizada pela presença da camada molecular, camada das células de Purkinje e camada de células granulares e a substância branca onde encontramos núcleos de células da neuroglia e muitas fibras, pois passam por aqui inúmeros axônios. Não houve diferenças histológicas entre os dois grupos de animais.

Figura 24 - Microscopia de luz do cerebello corado pela técnica de violeta cresil modificada (40x)

FONTE: GUIMARÃES, K. O. P., 2015.

Legenda: Imagens representativas das observações da microscopia das células da região do cerebello. (* amarelo) Camada granular; (* vermelho) Camada de células de Purkinje; (* verde) Camada molecular; (Seta cheia) Corpos das células de Purkinje; (Seta vazia) Dendritos das células de Purkinje; (Seta verde) Núcleo da célula de Purkinje; (Seta vermelha) Citoplasma da célula de Purkinje; (Seta branca) Neurônios; (Ponta da seta) Células da neuroglia/neurônios. Animais do grupo controle nomeados como Controle 1 e Controle 2. Animais do grupo com distrofia muscular, nomeados como GRMD 1, GRMD 2, GRMD 3, GRMD 4 e GRMD 5. Não foram observadas alterações marcantes entre os grupos através da técnica utilizada.

No maior aumento da substância cinzenta do cerebelo observamos suas três camadas: a mais interna é a camada granular composta por grande quantidade de neurônios bem pequenos onde vemos os núcleos arredondados; a camada seguinte caracterizada por uma camada de células de Purkinje que são células grandes em relação as demais células da substância cinzenta com núcleo grande arredondado, nucléolo evidente, por vezes sendo possível a visualização de parte do citoplasma e de seus axônios; e a camada molecular que é a camada mais externa onde vemos os núcleos de neurônios pequenos e de células da neuroglia, e ainda algumas fibras que são os axônios.

A arquitetura celular no cérebro e cerebelo foi semelhante nos animais GRMD e nos animais do grupo controle, tanto no tipo celular como na quantidade de células. A morfologia microscópica de neurônios, células de Purkinje e células da neuroglia se mostrou sem alterações e sem diferenças entre os grupos analisados.

7 DISCUSSÃO

Hoje sabemos que a distrofina exerce um papel importantíssimo no SNC, e sua ausência nos pacientes distróficos parece estar envolvida com déficit cognitivo (LIDOV, 1996; PILGRAM et al., 2010), além de possivelmente causar uma alteração significativa na estrutura do cérebro (CYRULNIK; HINTON, 2008). A deficiência cognitiva verificada na DMD também já foi relatada no modelo animal mais utilizado para estudos relacionados à DMD, o camundongo mdx (VAINZOF et al., 2008; MCGREEVY et al., 2015), onde o sinal mais evidente foi a diminuição na memória recente (ANDERSON et al., 2002). Entretanto, o mdx apresenta diferenças importantes em relação às manifestações clínicas da doença quando comparado aos pacientes DMD (VAINZOF et al., 2008; BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013; MCGREEVY et al., 2015). Além disso, o tamanho desses animais é muito diferente dos meninos com DMD, dificultando a análise dos sintomas clínicos, e ainda possíveis testes terapêuticos (DUAN, 2015).

O modelo animal considerado atualmente como o mais semelhante aos pacientes DMD, tanto em relação a manifestação clínica da doença como no que concerne à alteração genética, são os cães GRMD (BRINKMEYER-LANGFORD; KORNEGAY, 2013). Afora as semelhanças clínicas, os GRMD têm peso corporal parecido com os meninos distróficos e basicamente os mesmos músculos afetados facilitando o estudo da progressão clínica da doença, o que os torna um bom modelo animal para testes terapêuticos, além de serem animais de fácil monitoramento (HOWELL et al, 1997). Entretanto, no modelo animal GRMD, não há literatura que descreva algum tipo de alteração cognitiva, muito embora isto possa ser sutilmente notado durante os cuidados e convívio com os animais do canil. Como o cão vive por anos, por vezes é difícil o acompanhamento dos animais por um mesmo cuidador. Testes de cognição desenvolvidos para os GRMD seriam de grande valia para este propósito. Diante destes achados, este trabalho teve como objetivo principal estudar aspectos do SNC em cães GRMD, já que existem poucos estudos a respeito do papel da distrofina nesse sistema, usando o encéfalo como órgão a ser investigado.

Os animais GRMD do nosso grupo apresentaram sinais clássicos da distrofia muscular que se iniciaram nas primeiras semanas após o nascimento. Estes sinais foram fraqueza, letargia, dificuldade para se alimentar desde muito novinhos devido à

hipertrofia da língua, menor ganho de peso diário, e dificuldade de sucção, todos de acordo com a literatura para GRMD (HOWELL et al., 1997; AMBROSIO et al., 2009). Estes sinais por vezes levavam a um comprometimento dos músculos cardíaco e respiratório, acarretando o óbito destes animais em idades variadas, assim como já foi visto por outros grupos de pesquisas com os GRMD (VALENTINE; CUMMINGS; COOPER, 1989; NGUYEN et al., 2002; COLLINS; MORGAN, 2003). Importante salientar, que assim como nos animais GRMD, os pacientes DMD também têm sinais de enfraquecimento e degeneração muscular desde a infância (KOENIG et al., 1987; ANDERSON et al., 2002) e o óbito também decorre de comprometimento cardíaco e respiratório (EMERY, 1993), o que enfatiza ainda mais o uso deste modelo animal como objeto de estudo da DMD, pois os sinais clínicos e evolução da doença tanto na espécie canina, como no homem, transcorrem de maneira progressiva muito semelhante (CYRULNIK; HINTON, 2008; VAINZOF et al., 2008). Em tempo, neste trabalho foram usados os três fenótipos descritos nos GRMD, classificados de acordo com a literatura (AMBROSIO et al., 2009), como o grave ou grau III, o moderado ou grau II, e o leve ou grau I. Assim como nos GRMD, em meninos com DMD também é possível observar graus diferentes de evolução da doença (ZATZ et al., 2014).

Alguns estudos já foram realizados no SNC de pacientes DMD, e é visível a diversidade nos resultados encontrados. Em necropsias de encéfalos de casos clássicos de meninos com DMD que vieram à óbito não foram observadas diferenças significativas (DUBOWITZ; CROME, 1969), sendo o mesmo resultado encontrado quando utilizada a técnica de ressonância magnética para analisar o órgão em meninos ainda em vida (AL-QUDAH et al., 1990). Mais recentemente, outra pesquisa utilizando também a ressonância magnética mostrou diferenças significativas nas microestruturas cerebrais entre meninos DMD e grupo controle (DOORENWEERD et al., 2014). Houve ainda um grupo de pesquisadores que encontrou alterações histológicas importantes em pacientes DMD (ITOH et al., 1999). Neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas na morfologia macroscópica do encéfalo que pudessem ser atribuídas como diferenciais entre os grupos de animais controles e distróficos, o que aparentemente pode estar de acordo com os primeiros trabalhos com humanos da literatura. Do mesmo modo, não foram observadas diferenças histológicas nos dois grupos usando a técnica de violeta cresil modificada. Como não existe nenhum outro trabalho analisando o encéfalo de animais GRMD, não foi possível a comparação dos resultados aqui relatados. Entretanto, é possível que a

técnica não tenha sido suficientemente sensível para detectar modificações significativas, ou que ainda, um grupo maior de animais GRMD e controles devam ser analisados em estudos futuros.

Vale ressaltar que neste estudo o modelo escolhido fez necessário o enfrentamento de diversas barreiras. Escolhendo o cão, é quase inevitável e bem evidente o vínculo afetivo entre pesquisador e modelo animal, pois historicamente os cães são animais cativantes para o homem. Além disso, o estudo só foi iniciado após o óbito dos animais, por morte natural ou eutanásia recomendada pelos médicos veterinários responsáveis pelo canil em função da evolução da doença. Nenhum animal deste estudo sofreu eutanásia para fins deste estudo. Ainda, houve grande dificuldade para a formação do grupo controle, pois houve a dependência da doação de cães que viessem a óbito, sem causas neurológicas relacionadas e que fossem doados pelos proprietários para fins desta pesquisa. O ideal era que o grupo controle fosse composto por animais da mesma raça que os animais do grupo afetado, ou seja, Golden Retriever. Porém, ao longo do trabalho, foi possível observar que os proprietários de animais desta raça tem uma ligação emocional muito forte com seus animais, sendo tratados como entes queridos, de suas famílias, até mesmo no momento de sua morte. Isto impossibilitou a doação desses animais, durante o período disponível para a realização deste trabalho, sendo então utilizados cães de raças variadas como o grupo controle. Estas características e dificuldades fazem deste trabalho, além de pioneiro, comparável aos estudos com humanos. Além disso, havia pouquíssima literatura disponível para a realização deste trabalho, como anatomia do SNC de cães, o processamento de órgãos do SNC, independente da espécie animal e o pouco detalhamento das técnicas de fixação e coloração do material encéfalo, fazendo necessários diversos testes até a obtenção do protocolo em que o material ficasse com uma boa qualidade ao final dos experimentos. Por fim, é importante considerar os cuidados com os animais do canil (fora o custo para manter um canil-biotério). É perceptível a imensa assistência que é necessária e o alto custo que envolve o cuidado dos GRMD, dependendo principalmente de pessoal qualificado para tal função (COOPER et al., 1988; COLLINS; MORGAN, 2003). Vale ressaltar que como a coleta do material dos animais distróficos envolvidos foi feita apenas após morte natural em decorrência da evolução da doença, não havia data específica, nem prazo para coleta de material, tornando esse tipo de estudo bastante incerto, repleto

de surpresas ao longo do experimento, sendo difícil planejar exatamente todo o estudo.

Como os estudos em meninos com DMD utilizam técnicas diversas, como tomografia computadorizada (YOSHIOKA et al., 1980), ressonância magnética (AL-QUDAH et al., 1990; DOORENWEERD et al., 2014), análise macroscópica após necropsia (DUBOWITZ; CROME, 1969) ou análise histológica (ITOH et al., 1999), estudos com GRMD também podem ser conduzidos neste sentido. É evidente a importância de estudos que investiguem a ação da distrofina e as consequências da sua deleção ou ausência no SNC.

8 CONCLUSÃO

- A coleta do encéfalo de cães pode ser realizada tanto por canulação das carótidas e perfusão do órgão quanto por imersão do mesmo após a retirada da caixa craniana;
- As diversas mensurações feitas no encéfalo não mostraram diferenças significativas entre os animais GRMD e os animais do grupo;
- Não foram observadas diferenças significativas na morfologia macroscópica do cérebro e cerebelo quando comparados animais GRMD e animais do grupo controle;
- A técnica de violeta cresil modificada é um ótimo método para visualização da arquitetura tecidual do encéfalo, considerando os núcleos dos neurônios e das células de Purkinje, porém não é um método eficaz para visualização de todo prolongamento neuronal (axônios e dendritos);
- Não houve diferença no arranjo celular ao comparar o cérebro e cerebelo dos animais GRMD e dos animais do grupo controle.

9 REFERÊNCIAS

- AL-QUDAH, A. A.; KOBAYASHI, J.; CHUANG, S.; DENNIS, M.; RAY, P. Etiology of intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. **Pediatric Neurology**, v. 6, n. 1, p. 57-59, 1990.
- AMBROSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P.; MARTINS, D. S.; ARAÚJO, K. P. C.; ZUCCONI, E.; BROLIO, M. P.; GIGLIO, R. F.; MORINI, A. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R.; FEITOSA, M. L. T.; VALADARES, M. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Identification of three distinguishable phenotypes in Golden retriever muscular dystrophy. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 389-396, 2009.
- ANDERSEN, B. B.; KORBO, L.; PAKKENBERG, B. A quantitative study of the human cerebellum with unbiased stereological techniques. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 326, n. 4, p. 549-560, 1992.
- ANDERSON, J. L.; HEAD, S. I.; MORLEY, J. W. Duchenne Muscular dystrophy and brain function. In: HEDGE M. **Muscular Dystrophy**. Australia: In Tech, 2012. p. 91-122.
- ANDERSON, J. L.; HEAD, S. I.; RAE, C.; MORLEY, J. W. Brain function in Duchenne muscular dystrophy [Review]. **Brain**, v. 125, n. 1, p. 4-13, 2002.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.
- BARBUJANI, G.; RUSSO, A.; DANIELI, G. A.; SPIEGLER, A. W.; BORKOWSKA, J.; PETRUSEWICZ, I. H. Segregation analysis of 1885 DMD families. Significant departure from the expected proportion of sporadic cases. **Human Genetic**, v. 84, n. 6, p. 522-526, 1990.
- BARTHÉLÉMY, I.; PINTO-MARIZ, F.; YADA, E.; DESQUILBET, L.; SAVINO, W.; SILVA-BARBOSA, S. D.; FAUSSAT, A.; MOULY, V.; VOIT, T.; BLOT, S.; BUTLER-BROWNE, G. Predictive markers of clinical outcome in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy. **Diseases Models & Mechanisms**, v. 7, n. 11, p. 1253-1261, 2014.
- BAUMEISTER, R.; GE, L. The worm in us- *Caenorhabditis elegans* as a model of human disease (Review). **Trends Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 147-148, 2002.
- BEENAKKER, E. A. C.; DE VRIES, FOCK, J.; J. M.; VAN TOL, M.; BROUWER, O. F.; MAURITS, N. M.; VAN DER HOEVEN, J. H. Quantitative assessment of calf circumference in Duchenne muscular dystrophy patients. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, n. 7-8, p. 639-642, 2002.

- BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LIU, L. A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a labrador retriever. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 3, p. 255-261, 2002.
- BRINKMEYER-LANGFORD, C.; KORNEGAY, J. N. Comparative genomics of X-linked muscular dystrophies: the Golden retriever model. **Current Genomic**, v. 14, n. 5, p. 336-342, 2013.
- CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nuclei acids research**, v. 16, n. 23, p. 11141-11156, 1988.
- CHAMBERS, S. P.; DOOD, A.; OVERALL, R.; SIREY, T.; LAM, L. T.; MORRIS, G. E.; LOVE, D. R. Dystrophin in adult zebrafish muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 3, p. 478–483, 2001.
- COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, n. 4, p. 165-172, 2003.
- COOPER, B. J.; WINAND, N. J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B. A.; HOFFMAN, E. P.; KUNKEL, L. M.; SCOTT, M. O.; FISCHBECK, K. H.; KORNEGAY, J. N.; AVERY, R. J.; WILLIAMS, J. R.; SCHMICKEL, R. D.; SYLVESTER, J. E. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, v. 334, p. 6178, p. 154–156, 1988.
- CYRULNIK, S. E.; HINTON, V. J. Duchenne muscular dystrophy: A cerebellar disorder? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 3, p. 486-496, 2008.
- DAOUD, F.; CANDELARIO-MARTINEZ, A.; BILLARD, J. M.; AVITAL, A.; KHELFAOUI, M.; ROZENVALD, Y.; GUEGAN, M.; MORNET, D.; JAILLARD, D.; NUDEL, U.; CHELLY, J.; MARTINEZ-ROJAS, D.; LAROCHE, S.; YAFFE, D.; VAILLEND, C. Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. 6574, 2009.
- DIAMOND, A. Close interrelation of motor development and cognitive development and of the cerebellum and pre-frontal cortex. **Child Development**, v. 71, n. 1, p. 44-56, 2000.
- DOORENWEERD, N.; STRAATHOF, C. S.; DUMAS, E. M.; SPITALI, P.; GINJAAR, I. B.; WOKKE, B. H.; SCHRANS, D. G.; VANDENBERGEN, J. C.; VANZWET, E. W.; WEBB, A.; VANBUCHER, M. A.; VERSCHUUREN, J. J.; HENDRIKSEN, J. G.; NIKS, E. H.; KAN, H. E. Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy. **Annals of Neurology**, v. 76, n. 3, p. 403-11, 2014.

DRAVIAM, R.; BILLINGTON, L.; SENCHAK, A.; HOFFMAN, E. P.; WATKINS, S. C. Confocal analysis of the dystrophin protein complex in muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, v. 24, n. 2, p. 262-272, 2001.

DUAN, D. Duchenne muscular dystrophy gene therapy in the canine model. **Human gene therapy clinical development**, v. 26, n. 1, p. 57-69, 2015.

DUBOWITZ, V.; CROME, L. The central nervous system in Duchenne muscular dystrophy. **Brain**, v. 92, n. 4, p. 805-8, 1969.

EBIHARA, S.; GUIBINGA, G. H.; GILBERT, R.; NALBANTOGLU, J.; MASSIE, B.; KARPATI, G.; PETROF, B. J. Differential effects of dystrophin and utrophin gene transfer in immunocompetent muscular dystrophy (mdx) mice. **Physiological Genomics**, v. 8, n. 3, p. 133-144, 2000.

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

ESTEVEES, A.; PRADA, I. L. S.; CARVALHO, A. F. Comparação do número de corpos neuronais de áreas do córtex cerebral de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 332-338, 2004.

FERNANDES, I. R. **Modelagem neuronal de pacientes com Distrofia muscular de duchenne utilizando células pluripotentes induzidas**. 2015. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade e Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GALAZ-VEGA, R.; HERNÁNDEZ-KELLY, L. C.; MÉNDEZ, J. A.; CISNEROS, B.; ORTEGA, A. Glutamate regulates dystrophin-71 levels in glia cells. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 2, p. 237-43, 2005.

GASCHEN, F.; BURGUNDER, J. M. Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. **Acta Neuropathologica**, v. 101, n. 6, p. 591–600, 2001.

GASCHEN, L.; LANG, J.; LIN, S.; ADÉ-DAMILANO, M.; BUSATO, A.; LOMBARD, C. W.; GASCHEN, F. P. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 4, p. 346–356, 1999.

GLICKSTEIN, M. Thinking about the cerebellum. **Brain**, v. 129, n. 2, p. 288-292, 2006.

GÓRECKI, D. C.; LUKASIUK, K.; SZKLARCZYK, A.; KACZMAREK, L. Kainate-evoked changes in dystrophin Messenger RNA levels in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 84, p. 467-477, 1998.

HASHIMOTO, K.; KANO, M. Synapse elimination in the developing cerebellum. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 24, p. 4667-4680, 2013.

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

ITOH, K.; JINNAI, K.; TADA, K.; HARA, K.; ITOH, H.; TAKAHASHI, K. Multifocal glial nodules in a case of Duchenne muscular dystrophy with severe mental retardation. **Neuropathology**, v. 19, n. 3, p. 322-327, 1999.

IVRY, R. B.; KEELE, S. W. Timing functions of the cerebellum. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 1, n. 2, p. 136-152, 1989.

JUNG, D.; FILLIOL, D.; METZ-BOUTIGUE, M. H.; RENDON, A. Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 [Dp71] from brain. **Neuromuscular Disorders**, v. 3, n. 5-6, p. 515-8, 1993.

KIM, T. W.; WU, K.; BLACK, I. B. Deficiency of brain synaptic dystrophin in human Duchenne muscular dystrophy. **Annals of Neurology**, v. 38, n. 3, p. 446-449, 1995.

KIM, T. W.; WU, K.; XU, J. L.; BLACK, I. B. Detection of dystrophin in the postsynaptic density of rat brain and deficiency in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 23, p. 11642-11644, 1992.

KNUESEL, I.; MASTROCOLA, M.; ZUELLIG, R. A.; BORNHAUSER, B.; SCHAUB, M. C.; FRITSCHY, J. M. Altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 4457-4462, 1999.

KOENIG, M.; HOFFMAN, E. P.; BERTELSON, C. J.; MONACO, E. P.; FEENER, C.; KUNKEL, L. M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell**, v. 50, n. 3, p. 509-17, 1987.

KOESTNER, A.; JONES, T. C. Sistema Nervoso. In: JONES T.C.; HUNT R. D.; NORVAL W. K. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000. p. 1281-1320.

KOHN, B.; GUSCETTI, F.; WAXENBERGER, M.; AUSBURGER, H. Muscular dystrophy in a cat. **Tierärztliche Praxis**, v. 21, n. 5, p. 451-457, 1993.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, J. R.; BOGAN, D. J.; CHILDERS, M. K.; LI, J.; NGHIEM, P.; DETWILER, D. A.; LARSEN, C. A.; GRANGEE, R. W.; BHAVARAJU-SANKA, R. K.; TOU, S.; KEENE, B. P.; HOWARD, J. F.; WANG, J.; FAN, Z.; SCHATZBERG, S. J.; STYNER, M. A.; FLANIGAN, K. M.; XIAO, X.; HOFFMAN, E. P. Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. **Mamm Genome**, v. 23, n. 1-2, p. 85-108, 2012.

LAING, N. G.; DAVIS, M. R.; BAYLEY, K.; FLETCHER, S.; WILTON, S. D. Molecular Diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: past, presente and future in relation to implementing therapies. **The Clinical Biochemical Reviews**, v. 32, n. 3, p. 129-134, 2011.

LAZZARO, V. D.; RESTUCCIA, D.; SERVIDEI, S.; NARDONE, R.; OLIVIERO, A.; PROFICE, P.; MANGIOLA, F.; TONALI, P.; ROTHWELL, J. C. Functional involvement of cerebral cortex in Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 21, n. 5, p. 662-664, 1998.

LEDERFEIN, D.; LEVY, Z.; AUGIER, N.; MORNET, D.; MORRIS, G.; FUCHS, O.; YAFFE, D.; NUDEL, U. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 12, p. 5346-5350, 1992.

LIDOV, H. G. W.; BYERS, T. J.; KUNKEL, L. M. The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. **Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 167-187, 1993.

LIDOV, H. G. W.; BYERS, T. J.; WATKINS, S. C.; KUNKEL, L. M. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. **Nature**, v. 348, n. 6303, p. 20/27, 1990.

LIDOV, H. G. W. Dystrophin in the nervous system. **Brain Pathology**, v. 6, n. 1, p. 63-77, 1996.

LORENZ, M.D.; KORNEGAY, J. N. **Neurologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2006. 467p.

MCGREEVY, J. W.; HAKIM, C. H.; MCINTOSH, M. A.; DUAN, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 8, n. 3, p. 195-213, 2015.

MCNALLY, E. M.; DUGGAN, D.; GOROSPE, J. R.; BONNEMANN, C. G.; FANIN, M.; PEGORARO, E.; LIDOV, H. G.; NOGUCHI, S.; OZAWA, E.; FINKEL, R. S.; CRUSE, R. P.; ANGELINI, C.; KUNKEL, L. M.; HOFFMAN, E. P. Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 11, p. 1841-1847, 1996.

MEHLER, M. F. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. **Brain Research Reviews**, v. 32, n. 1, p. 277-307, 2000.

MINCIACCHI, D.; DEL TONGO, C.; CARRETTA, D.; NOSI, D.; GRANATO, A. Alterations of the cortico-cortical network in sensori-motor areas of dystrophin deficient mice. **Neuroscience**, v. 166, n. 4, p. 1129-1139, 2010.

MOSER, H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenic aspects and genetic prevention. **Human Genetics**, v. 66, n. 1, p. 17-40, 1984.

MOURA, M. C. D. S.; WUTZKI, H. C.; VOOS, M. C.; RESENDE, M. B. D.; REED, U. C.; HASUE, R. H. Is functional dependence of Duchenne muscular dystrophy patients determinant of the quality of life and burden of their caregivers? **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 73, n. 1, p. 52-57, 2015.

MUNTONI, F.; MATEDDU, A.; SERRA, G. Passive avoidance behavior deficit in the mdx mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 1, n. 2, p. 121-123, 1991.

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

PASSOS-BUENO, M. R.; MARIE, S. K.; MONTEIRO, M.; NEUSTEIN, I.; WHITTLE, M. R.; VAINZOF, M.; ZATZ, M. Knobloch syndrome in a large Brazilian consanguineous family: Confirmation of autosomal recessive inheritance. **American Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 2, p. 170–173, 1994.

PILGRAM, G. S. K.; POTIKANOND, S.; BAINES, R. A.; FRADKIN, L. G.; NOORDERMEER, J. N. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. **Molecular Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2010.

PINTO, M. L.; TOKUNAGA, H. H. V. O.; SOUCCAR, C.; SCHOORLEMMER, G. H. M.; LAPA, R. C. R. S. Loss of neuronal projections in the dystrophin-deficient mdx mouse is not progressive. **Brain Research**, v. 1224, p. 127-132, 2008.

PRADA, I. Cerebelo. In: _____. **Neuroanatomia Funcional em Medicina Veterinária com correlações clínicas**. São Paulo: Terra Molhada. 2014. cap. 10. p. 257-322.

ROBERTS, R. G.; COFFEY, A. J.; BOBROW, M.; BENTLEY, D. R. Exon structure of the human dystrophin gene. **Genomics**, v. 16, n. 2, p. 536-538, 1993.

RUBINSTEIN, A.L. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery (Review). **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 6, n. 2, p. 218–223, 2003.

SALAM, E. A.; ABDEL-MEGUID, I. E.; SHATLA, R.; KORRAA, S. Evaluation of neural damage in Duchenne muscular dystrophy patients. **Acta Myologica**, v. 33, n. 1, p. 13-18, 2014.

SNOW, W. M.; ANDERSON, J. E.; JAKOBSON, L. S. Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 5, p. 743-752, 2013.

SNOW, W. M.; ANDERSON, J. E.; FRY, M. Regional and genotypic differences in intrinsic electrophysiological properties of cerebellar Purkinje neurons from wild-type and dystrophin-deficient mdx mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 107, p. 19-31, 2014.

SNOW, W. M.; FRY, M.; ANDERSON, J. E. Increased Density of Dystrophin Preprotein in the lateral versus the vermal mouse cerebellum. **Cellular and Molecular Neurobiology**. V. 33, n. 4, p. 513-520, 2013.

TRACEY, I.; SCOTT, R. B.; THOMPSON, C. H.; DUNN, J. F.; BARNES, P. R.; STYLES, P.; KEMP, G. J.; RAE, C. D.; PIKE, M.; RADDA, G. K. Brain abnormalities in Duchenne muscular dystrophy: phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and neuropsychological study. **The Lancet**, v. 345, n. 8960, p. 1260-1264, 1995.

UCHINO, M.; TERAMOTO, H.; NAOE, H.; YOSHIOKA, K.; MIKE, T.; ANDO, M. Localisation and characterisation of dystrophin in the central nervous system of controls and patients with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 57, n. 4, p. 426-429, 1994.

VAILLEN, C.; UNGERER, A.; BILLARD, J. M. Facilitated NMDA receptor-mediated synaptic plasticity in the hippocampal CA1 area of dystrophin-deficient mice. **Synapse**, v. 33, n. 1, p. 59-70, 1999.

VAINZOF, M.; AYUB-GUERRIERI, D.; ONOFRE, P. C. G.; MARTINS, P. C. M.; LOPES, V. F.; ZILBERZTAJN, D.; MAIA, L. S.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animal Models for Genetic Neuromuscular Diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, n. 3, p. 241-248, 2008.

VAINZOF, M.; MOREIRA, E. S.; CANOVAS, M.; ANDERSON, L. V.; PAVANELLO, R. C.; PASSOS-BUENO, M. R.; ZATZ, M. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 6, p. 984-948, 2000.

VALENTINE, B. A.; CUMMINGS, J. F.; COOPER, B. J. Development of Duchenne-type cardiomyopathy: morphologic studies in a canine model. **The American Journal of Pathology**, v. 135, n. 4, p. 671-678, 1989.

VERHAERT, D.; RICHARDS, K.; RAFAEL-FORTNEY, J. A.; RAMAN, S. V. Cardiac involvement in patients with muscular dystrophies: magnetic resonance imaging phenotype and genotypic considerations. **Circulation Cardiovascular Imaging**, v. 4, n. 1, p. 67-76, 2011.

YOSHIOKA, M.; OKUNA, T.; HONDA, Y.; NAKANO, Y. Central nervous system involvement in progressive muscular dystrophy. **Archives of Disease in Childhood**, v. 55, n. 8, p. 589-594, 1980.

ZATZ, M.; PAVANELLO, R. C. M.; LAZAR, M.; YAMAMOTO, G. L.; LOURENÇO, N. C. V.; CERQUEIRA, A.; NOGUEIRA, L.; VAINZOF, M. Milder course in Duchenne patients with nonsense mutation and no muscle dystrophin. **Neuromuscular Disorders**, v. 24, n. 11, p. 986-989, 2014.

ZATZ, M.; VIEIRA, N. M.; ZUCCONI, E.; PELATTI, M.; GOMES, J.; VAINZOF, M.; MARTINS-BACH, A. B.; OTADUY, M. C. G.; SANTOS, G. B.; AMARO, E.; LANDINI, V.; ANDRADE, T. A normal life without muscle dystrophin. **Neuromuscular Disorders**, v. 25, n. 5, p. 371-374, 2015.

ZHOU, S.; CHEN, L. Neural integrity is maintained by dystrophin in *C. elegans*. **The Journal of Cell Biology**, v. 192, n. 2, p. 349-363, 2011.