

Introdução

O sistema endócrino regula e coordena as actividades celulares em todo o corpo, permitindo que as células e tecidos trabalhem em conjunto como um organismo único ⁴⁴. Este sistema é responsável pelo crescimento, desenvolvimento e comportamento do organismo. Nos humanos, o sistema endócrino é constituído por sete glândulas especializadas: a glândula pituitária, a paratiróide, o timo, as glândulas adrenais, o pâncreas, a tiróide e as gónadas, e suplementados por vários tecidos endócrinos ⁴⁴. Estes órgãos e tecidos produzem diferentes tipos de sinais endócrinos. Os sinais endócrinos podem ser constituídos por cadeias de aminoácidos ou péptidos (como a insulina e a hormona do crescimento), por esteróides (como os estrogénios e a testosterona), por tirosina iodada (como as hormonas da tiróide) e por ácido araquidónico (como as prostaglandinas) ⁴⁴.

O sistema endócrino é influenciado por uma grande quantidade de compostos químicos. Os compostos bioactivos são encontrados na maioria dos poluentes, incluindo dioxinas e furanos, compostos orgânicos halogenados e pesticidas ⁴⁴.

As hormonas da tiróide interagem com os vários sistemas do organismo, um dos quais o sistema muscular. Quando há um aumento destas hormonas, o músculo reage de forma energética, mas quando esta quantidade se torna excessiva, o músculo enfraquece devido à sobrecarga do metabolismo proteico ⁵.

Este trabalho de mestrado tem como objectivo a revisão bibliográfica sobre os vários métodos moleculares utilizados actualmente: a genómica, a proteómica e a metabolómica, com particular enfoque na utilização destes para a detecção das lesões moleculares, precedentes das alterações morfológicas.

Este trabalho de mestrado inclui uma contribuição pessoal, onde pretendemos dar o nosso contributo na caracterização do perfil metabólico dos músculos mastigadores, que permitirá no futuro a sua avaliação molecular num modelo de hipertiroidismo experimental.

Aspectos Morfofuncionais dos Músculos Mastigadores

Tecido Muscular

O tecido muscular é constituído por células alongadas, que possuem grande quantidade de filamentos citoplasmáticos de proteínas contrácteis, geradoras das forças necessárias para a contracção do músculo, com consumo de energia contida nas moléculas de ATP ³⁴.

De acordo com as suas características morfológicas e funcionais, distinguem-se três tipos de tecido muscular. O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células cilíndricas muito longas e multinucleadas, que apresentam estriações transversais; as suas fibras têm contracção rápida e vigorosa, sujeitas ao controlo voluntário. O músculo estriado cardíaco, cujas células também possuem estriações transversais e é formado por células alongadas e ramificadas, que se unem por intermédio dos discos intercalares (exclusivas deste tipo de músculo); a sua contracção é involuntária, vigorosa e rítmica. O músculo liso é formado por aglomerados de células fusiformes que não possuem estrias transversais; o seu processo de contracção é lento e involuntário ³⁴.

Histofisiologia do músculo esquelético

As células musculares são células contrácteis, adaptadas especialmente para gerar forças contrácteis através da interacção de cadeias das proteínas actina e miosina ³⁵. Fazem ainda parte do grupo de células contrácteis: as células mio-epiteliais, os mio-fibroblastos e os perícitos ³⁵. Os perícitos encontram-se em redor dos vasos sanguíneos. São células lisas, semelhantes às células musculares. Os mio-fibroblastos têm um papel de contracção, para além de poderem segregar colagénio. As células mio-epiteliais, por sua vez, são uma componente importante de algumas glândulas excretoras ³⁵.

As células musculares esqueléticas são a base estrutural e funcional dos músculos, responsáveis pelos movimentos voluntários sob a influência do sistema nervoso central e pela manutenção da postura corporal ³⁵.

Cada célula do músculo esquelético é multinucleada, pois na embriogénese os mioblastos (células precursoras) juntam-se e fundem-se, havendo vários núcleos que se deslocam para a periferia das células, podendo mesmo encontrar-se na proximidade da membrana citoplasmática ³⁵. As células do músculo esquelético são longas e finas, de forma cilíndrica, possuem um diâmetro de aproximadamente 50 a 60 µm, atingindo comprimentos até 10 cm ^{34,35}.

Durante a diferenciação dos mioblastos há um aumento da expressão das proteínas actina e miosina, sendo estas posteriormente alinhadas em sarcómeros. Estes são

colocados topo-a-topo e alinhados na perfeição para formarem uma unidade estrutural celular: as miofibrilhas, que ocupam a totalidade do citoplasma muscular ³⁶.

Organização do músculo esquelético

Num músculo, como por exemplo, o músculo deltóide ou o masseter, as fibras musculares estão organizadas em grupos de feixes, sendo o conjunto de feixes envolvido por uma camada de tecido conjuntivo – epimísio ³⁴. Desta camada partem finos septos de tecido conjuntivo que se dirigem para o interior do músculo, separando os feixes. Estes septos designam-se de perimísio, e envolvem os feixes de fibras ³⁴. Cada fibra muscular é envolvida individualmente pelo endomísio, que é formado pela lâmina basal da fibra muscular, associada a fibras reticulares. O endomísio apresenta uma população celular escassa, constituída por fibroblastos ³⁴. Todas estas membranas de tecido conjuntivo unem-se, unindo também todas as fibras musculares e permitindo que a força de contracção gerada por cada delas actue sobre o músculo inteiro. Este tecido conjuntivo desempenha um papel funcional muito importante, até porque algumas vezes as fibras musculares não se estendem de uma extremidade do músculo até à outra ³⁴. É ainda por intermédio do tecido conjuntivo que as forças de contracção musculares são transmitidas a outras estruturas, como sejam tendões e ossos ³⁴.

As fibras musculares também apresentam uma estrutura complexa. Quando observadas ao microscópio óptico, estas mostram estriações transversais, pela alternância de feixes claros e escuros ³⁴. Foi realizada a sua classificação após observação ao microscópio de luz polarizada, onde se verificou que a banda escura era anisotrópica, atribuindo-se o nome de banda A, enquanto que a banda clara era isotrópica, assim designada de banda I ³⁴. No centro de cada banda I verifica-se uma linha transversal escura – a linha Z ³⁴. As estriações das miofibrilhas ocorrem pela repetição das unidades - sarcómeros. Cada sarcómero mede aproximadamente 2,5 µm e é formado pela parte da miofibrilha que fica entre duas linhas Z sucessivas e contém uma banda A a separar duas semi-bandas I ³⁴. Cada fibra muscular contém muitos filamentos cilíndricos - miofibrilhas, que têm um diâmetro de 1 a 2 µm, são paralelas ao eixo maior da fibra muscular e consistem num arranjo perfeito e repetitivo de sarcómeros ³⁴.

Ao observar as miofibrilhas à microscopia electrónica de varrimento, estas revelam a presença de filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina dispostos longitudinalmente nestas, e organizados numa distribuição simétrica e paralela ³⁴. Esta organização é mantida por várias proteínas, como por exemplo, os filamentos intermediários de desmina (ligam as miofibrilhas umas às outras). Para além das proteínas actina e miosina, as miofibrilhas do músculo esquelético possuem ainda tropomiosina, que são proteínas com cerca de 40 nm de comprimento que se unem umas

às outras pelas extremidades para formar filamentos que se localizam ao longo do sulco existente entre dois filamentos de actina³⁴. As miofibrilhas possuem também troponina, um complexo de três sub-unidades proteicas: o TnT (liga-se fortemente à tropomiosina); o TnC (que permite a ligação com iões cálcio); e o TnI (que cobre o local activo da actina, onde ocorrem as interacções entre a actina e a miosina, permitindo os movimentos musculares, através de contracções)³⁴. Cada molécula de tropomiosina possui um local específico para a ligação deste complexo.

As fibras musculares esqueléticas podem ser de dois tipos: fibras de contracção lenta (fibras S ou tipo 1) ou fibras de contracção rápida (fibras F ou tipo 2). Esta classificação assume relevância, uma vez que a cada unidade motora está associada apenas um destes tipos de fibras^{36,53}. As fibras de contracção lenta são menos susceptíveis à fadiga, o que significa que suportam estímulos prolongados³⁶. Possuem uma grande densidade de capilares e mitocôndrias e têm armazenado grandes quantidades de energia, sob a forma de lípidos, bem como a mioglobina, que representa o organelo de armazenamento de oxigénio de curta duração^{36,53}. As fibras de contracção rápida caracterizam-se por contracções musculares extremamente rápidas e breves, pelo que sofrem fadiga rapidamente. Possuem grandes quantidades de glicogénio, mas quantidades reduzidas de mioglobina³⁶. Todos os músculos da mastigação contêm uma mistura destes tipos de fibras, sendo que as fibras do tipo I representam uma pequena parte das fibras dos músculos mastigadores³⁶.

A contracção muscular é influenciada pela disponibilidade de iões Ca^{2+} (cálcio), havendo relaxamento muscular quando a sua concentração diminui no sarcoplasma. O retículo sarcoplasmático armazena e regula o fluxo dos iões Ca^{2+} ³⁴. Quando a membrana do retículo sarcoplasmático é despolarizada através de estímulos nervosos, dá-se a abertura dos canais de Ca^{2+} , e os iões de cálcio saem por difusão passiva, actuando sobre a troponina e favorecendo a formação de pontes entre a actina e a miosina. Quando a despolarização termina, a membrana do retículo sarcoplasmático, por processo activo, transfere iões cálcio para o interior das suas cisternas, interrompendo a actividade contráctil e consumindo energia³⁴.

A contracção das fibras musculares esqueléticas é comandada por nervos motores que se ramificam no tecido conjuntivo do perimísio, onde cada nervo origina numerosos ramos. O ramo terminal do nervo, no local de contacto com a fibra muscular, perde a sua bainha de mielina e forma uma dilatação que se posiciona no interior de uma depressão da superfície da fibra muscular – denomina-se de placa motora ou junção mioneural³⁴. Quando uma fibra do nervo motor recebe um impulso nervoso, o terminal axónico liberta acetilcolina, que se difunde através da fenda sináptica e vai se prender aos receptores

situados no sarcolema das dobras juncionais. A ligação com o neurotransmissor faz com que o sarcolema fique mais permeável ao sódio, o que resulta na despolarização muscular. O excesso de acetilcolina é hidrolisado pela colinesterase que se encontra na fenda sináptica. A sua destruição é necessária de forma a evitar o contacto prolongado deste com os receptores do sarcolema ³⁴. A despolarização que se iniciou na placa motora propaga-se ao longo da membrana da fibra muscular e penetra em profundidade através do sistema de túbulos transversais. Em cada tríade o sinal de despolarização passa para o retículo sarcoplasmático e resulta na libertação de cálcio, que dá início ao ciclo de contracção. Quando a despolarização termina, o cálcio é transportado de forma activa para as cisternas do retículo sarcoplasmático e a fibra muscular relaxa ³⁴.

A fibra nervosa e as fibras musculares por ela inervadas formam uma unidade motora ³⁴. As variações na força de contracção do músculo são devidas às variações no número de fibras que contraem num determinado momento, pelo que a contracção do músculo vai depender do número de unidades motoras accionadas ³⁴.

Avaliação Molecular de Músculos Mastigadores

Muitas das doenças resultam de alterações específicas e características no perfil químico e bioquímico dos tecidos e fluidos biológicos ²⁹. As medições directas das expressões proteica e metabólica são essenciais para o estudo dos processos biológicos quer no indivíduo saudável, quer no doente, permitindo a identificação das causas da doença e de biomarcadores, bem como da sua progressão toxicológica ²⁹. Os avanços do instrumental e das técnicas analíticas nas últimas décadas permitiu a análise global de compostos biológicos como o DNA (genómica), RNA (transcriptómica), proteínas (proteómica) e pequenas moléculas (metabolómica) ^{29,33}.

Metabolómica

A análise metabolómica consiste em identificar o maior conjunto de metabolitos visíveis à técnica e na medida do possível quantificá-los, comparando-os posteriormente com amostras puras disponíveis em bases de dados ^{17,18,19,22,29}. Dedicar-se ao estudo da sua composição, dinâmica, interacções e respostas a mudanças ambientais nas células, tecidos e biofluidos ²³. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR) é a ferramenta de eleição na metabolómica ¹⁷. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear por protão uni-dimensional acumula a vantagem de ser sensível e de permitir quantificar, aproveitando em parte mecanismos de processamento de dados semi-automáticos ¹⁷. A espectroscopia de ressonância magnética bi-dimensional começou a ser usada na metabolómica muito recentemente, tendo como vantagens uma maior especificidade para detecção de metabolitos e a resolução de superimposições unidimensionais do espectro, enquanto mantém uma boa sensibilidade, especialmente em associação com os cilindros de alta resolução, tais como as usadas no *high resolution magic angle spinning* (HRMAS) ¹⁷.

As aplicações da metabolómica expandiram-se com as técnicas de proteómica e genómica, com o objectivo de determinar a função dos genes em microorganismos, plantas e animais ^{18,28}. Actualmente, tem várias aplicações, como a determinação de biomarcadores metabólicos que se alteram na presença de doença ou em resposta a intervenções medicamentosas; a determinação do efeito bioquímico ou stress ambiental em plantas ou microorganismos, o que inclui as plantas geneticamente modificadas; a caracterização bacteriana; a avaliação da saúde nos humanos; e a engenharia metabólica ^{18,25,27,28,30}.

A MS (espectroscopia de massa) e a NMR são as principais plataformas tecnológicas utilizadas para determinar o perfil metabolómico, ambas com vantagens e desvantagens. A maior vantagem na utilização da espectrometria de massa é a sua sensibilidade.

Quando combinada com a cromatografia líquida (LS), a MS consegue facilmente detectar centenas de espécies individuais numa única amostra clínica ^{21,26,27,28,32,33}.

A MS fornece uma análise quantitativa e qualitativa selectiva, rápida e sensível, e possui a capacidade de identificação dos metabolitos. Os espectrómetros de massa funcionam por formação iónica e separação destes de acordo com a sua relação massa e carga, com capacidade de detectar iões separados ^{18,25,27}.

Os metabolitos não possuem o modelo de fragmentação dos péptidos, tornando a sua identificação mais difícil. A sua quantificação, que é crítica para o reconhecimento de potenciais biomarcadores, é uma das falhas da MS. Existem diversos factores que influenciam a intensidade do sinal de um composto na MS, incluindo a composição da mistura ²¹. Para maximizar a cobertura metabolómica, a MS recorre à cromatografia líquida (LS) para separar os metabolitos antes da análise, o que significa que cada amostra necessita de horas para ser analisada ^{21,29}.

Em metabolómica, a espectroscopia NMR é um método rápido, não destrutivo, que fornece muita informação e requer uma preparação mínima da amostra ^{18,19,20,24,29,31}. Esta técnica tira vantagem das propriedades rotacionais dos núcleos dos átomos ¹⁹. A espectroscopia NMR funciona através da aplicação de campos magnéticos fortes e frequências rádio aos núcleos dos átomos. Para os átomos quer com número atómico ímpar, quer com número de massa ímpar, a presença de um campo magnético vai causar rotação no núcleo (rotação nuclear) ¹⁸. A absorção da energia das frequências rádio vai fazer com que o núcleo do átomo passe de uma rotação baixa para uma alta rotação, e a subsequente emissão de radiação durante o processo de relaxamento deste é detectada por uma sonda ^{18,19}.

A espectroscopia por NMR apresenta como vantagens a reprodutibilidade, a capacidade de quantificar compostos em misturas, bem como a capacidade de identificar metabolitos desconhecidos. Outra característica da NMR é a sua versatilidade para analisar metabolitos no estado líquido, em tecidos intactos ou *in vivo*. No entanto a MS é mais sensível do que a NMR ^{21,24,29,30,33}.

O controlo das amostras a analisar deve ser rigoroso, uma vez que pequenas mudanças na temperatura, pH e a presença de impurezas ou degradação da amostra pode levar à detecção de mudanças metabólicas falsas, bem como indicar erradamente diferentes metabolitos ^{19,23,29}.

Genómica

A genómica é o estudo do genoma dos organismos, ou seja, o estudo de todos os genes da célula/tecido ao nível do DNA (genótipo), RNAm (transcriptómica) ou proteínas (proteoma). As ferramentas mais importantes nesta técnica são os *microarrays* ⁶¹.

Com a publicação da sequência do genoma humano, as prioridades dos investigadores passaram da identificação dos genes para a compreensão da sua função na fisiologia celular ⁴³. Uma forma clássica de monitorizar a actividade génica é medir a quantidade de RNAm (RNA mensageiro) ⁴³. Os *microarrays* de DNA quando aplicados à análise da expressão, permite a medição dos níveis de RNAm de todo um organismo ^{43,47,56}.

Os *microarrays* de DNA são lâminas crivadas com fragmentos de DNA, cada um contendo uma sequência de nucleótidos que irá servir como "sonda" para um gene específico. Permitem a diferenciação em duas dimensões e são muito pequenos, tipicamente constituídos por vidro ou silicone ^{43,44,45,46,47,48,50,54,62}. No seu interior os fragmentos de DNA são depositados ou sintetizados numa matriz de alta densidade, com uma ordem pré-definida ⁴³. De todos os materiais disponíveis para os *microarrays* de DNA, os de vidro são os que se encontram mais adaptados à detecção fluorescente, sendo os únicos que permitem sobreposição dos *arrays* para comparação ⁴⁵. Além disso, são mais fáceis de manipular, têm maior sensibilidade e resistência ⁴⁵.

A técnica com os *microarrays* de DNA consiste na extracção do RNAm das células-alvo do estudo e a sua cópia sobre a forma de DNA complementar (DNAc) através de transcrição reversa; este é mais fácil de trabalhar do que o RNAm. O DNAc é marcado com uma sonda fluorescente. O *microarray* de DNA é incubado com o DNAc marcado e é hibridizado. Posteriormente, o *microarray* é lavado para promover a remoção de moléculas não-ligadas; as posições nas quais os fragmentos de DNA marcados hibridizaram são identificadas como pontos fluorescentes por um microscópio automatizado de varrimento a laser ^{43,45,46,47,48,50,53,59,61}. As posições do DNA no *array* são comparadas com outro *array* ou com genes dum software informático específico, correspondendo cada um dos círculos a um gene específico ^{45,47,48,49,50,51,58,59}.

Os *microarrays* de DNA revolucionaram a maneira de analisar os genes, uma vez que permitem a monitorização dos produtos de RNA de milhares de genes ao mesmo tempo ^{43,44,45,48,50,51,52,53}.

A maior aplicação dos *microarrays* de DNA é a quantificação da expressão génica em várias situações experimentais que incluem a descoberta génica para os genes potencialmente envolvidos nos processos patológicos, fisiológicos e do desenvolvimento; a realização do perfil das neoplasias; a regulação génica para a descrição das redes

reguladoras, assumindo que os genes que se regulam em paralelo têm mecanismos de controlo comum; o diagnóstico, para a identificação dos padrões da expressão génica relacionada com o estado de doença, que podem ser usados como indicadores de diagnóstico e prognóstico; e a farmacologia, para verificar qual o medicamento mais indicado para determinada patologia, o que permite a personalização da medicação utilizada ^{45,52,55,56,57,60,61,63}.

Os *microarrays* de DNA também podem ser utilizados para identificar variações na sequência de DNA, quer em situações patogénicas (mutações) ou não patogénicas (polimorfismos) ^{43,45,59}.

Proteómica

A proteómica define-se como o estudo de todas as proteínas produzidas pelas células/organismo, o que envolve a identificação das proteínas presentes no corpo e a determinação do seu papel nas funções fisiológicas e fisiopatológicas ^{38,46,70}.

No passado, o estudo das proteínas e a sua associação com doenças apresentava várias limitações, em particular as relacionadas com os anticorpos específicos utilizados para identificar péptidos e antigénios, e que davam na generalidade resultados pouco satisfatórios ³⁹.

Com o desenvolvimento da separação das proteínas, usando o gel de electroforese bidimensional (2-DE), a cromatografia líquida multidimensional e a identificação de proteínas por espectrometria de massa (MS), a proteómica moderna passou a conseguir a obtenção de melhores resultados ^{39,46}. Estes instrumentos/técnicas não só facilitaram a separação e identificação das proteínas, como também permitiu a obtenção de informação acerca das redes proteicas ^{38,39}.

A separação das proteínas é o passo inicial para a análise da expressão proteica. Esta pode ser feita por um método selectivo ou não-selectivo. Os métodos selectivos têm como objectivo identificar uma única proteína da amostra com propriedades específicas, sendo semelhante à purificação da proteína ³⁹. Os métodos não-selectivos, por sua vez, fraccionam misturas complexas antes da análise ³⁹.

Várias técnicas podem ser utilizadas para separar a mistura de proteínas. No entanto, a técnica de separação seleccionada deve ser capaz de fraccionar eficazmente misturas complexas de proteínas, ou seja, fornecer uma proteína individual ou um número limitado de proteínas. As duas técnicas de separação de proteínas que são usadas mais frequentemente na proteómica são o gel de electroforese e a cromatografia líquida ³⁹.

O gel de electroforese uni-dimensional (1-DE) é um método frequentemente utilizado para a separação de proteínas, pois é uma técnica relativamente simples, acessível e facilmente reproduzível³⁹. Esta técnica consiste, de uma forma geral, na separação de uma amostra de proteínas em bandas de acordo com os seus diferentes pesos moleculares, por electroforese, utilizando um gel com suporte de acrilamida³⁹.

Por sua vez, o gel de electroforese bi-dimensional (2-DE) baseia-se no princípio de que as proteínas não só possuem diferentes pesos moleculares, como também possuem pontos isoeléctricos (pI) diferentes^{38,39,69}. A primeira dimensão de separação na 2-DE é a que consiste na migração das proteínas através de um gradiente de pH, até que cada proteína se encontre numa concentração de pH equivalente ao seu pI. A segunda dimensão de separação é geralmente feita através de um gel de poli(acrilamida), em que as proteínas são separadas de acordo com o seu peso molecular^{38,39}. A maioria das proteínas são separadas por carga na direcção horizontal e por massa na direcção vertical³⁸. A principal limitação desta técnica era a sua pouca reprodutibilidade, mas esta já foi ultrapassada devido ao desenvolvimento de gradientes de pH estáticos^{38,39}. Nos dias de hoje, a 2-DE está sempre associada à utilização da MS³⁸.

A cromatografia é aplicada para separar e analisar moléculas complexas, o que inclui as proteínas^{38,39}. Os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel que se infiltra na fase estacionária³⁹. Uma mistura com várias moléculas é dissolvida com um solvente e aplicada numa matriz cromatográfica, e os diferentes componentes eluem pelo sistema a diferentes velocidades. As diferentes taxas de migração resultam da interacção mais ou menos favorável das moléculas com a matriz, o que significa que as moléculas com mais afinidade com esta progridem mais. A cromatografia líquida (LS) é a mais aplicada na proteómica, desde que se mostrou compatível com a MS^{38,39}.

Após a separação da mistura complexa de proteínas em componentes individuais, o próximo passo é a sua identificação. O método para tal mais amplamente usado é a MS³⁹.

A identificação de proteínas esteve durante muito tempo limitada devido ao seu custo elevado e resultados pouco satisfatórios³⁹. Por exemplo, o *Western blotting* e a imunohistoquímica são técnicas comuns e fidedignas utilizadas para confirmar a presença de proteínas específicas. No entanto, apenas uma proteína pode ser detectada de cada vez, sem falar na necessidade de um anticorpo específico para a proteína em questão³⁹. A aplicação da MS à proteómica permite a identificação directa e simultânea de um grande número de proteínas funcionais num sistema biológico particular, pelo que se tornou o método de eleição^{39,40}. A MS é uma técnica que permite separar os iões de

acordo com a sua relação massa e carga ^{38,39}. A sua maior vantagem é a capacidade de detectar proteínas de baixo peso molecular, que normalmente a 2-DE não consegue detectar ^{39,41}.

Depois de se obter a sequência de péptidos é necessário analisar e fazer a correspondência das proteínas pesquisadas na base de dados ³⁹.

A proteómica é extensamente aplicada no estudo das proteínas envolvidas na carcinogénese, bem como na procura de biomarcadores para uso clínico ³⁸.

Os últimos objectivos da proteómica vão além da simples catalogação das proteínas que as células expressam no indivíduo saudável e sua comparação com o indivíduo doente ⁴¹. O objectivo principal é elucidar a organização e a dinâmica das redes metabólicas, sinalizadoras e reguladoras através das quais a vida da célula se processa ⁴¹. Além disso, a proteómica procura compreender como essas redes se tornam disfuncionais na doença, e prever como a sua função pode ser manipulada através da utilização de fármacos e da manipulação genética ^{41,42}.

Imunohistoquímica

A imunohistoquímica consiste na utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais para detectar antígenos específicos em cortes de tecido ⁶⁴. É uma técnica coadjuvante que não substitui o diagnóstico morfológico tradicional ⁶⁴.

Representa uma ferramenta importante e poderosa na identificação e localização de uma ampla variedade de antígenos em cortes de parafina, tecidos congelados e preparações celulares ^{65,67,68}. Por outro lado, este método permite a detecção de depósitos de tecido anormal, bem como a determinação do imunofenótipo das células normais e dos seus homólogos neoplásicos ^{65,66}. Assim, tem sido útil na determinação da linhagem das células tumorais, propagação e metástases, bem como dos factores de prognóstico ^{65,66}. Desta forma, a imunohistoquímica pode ter aplicações terapêuticas em muitas doenças ⁶⁵.

As técnicas de imunohistoquímica são métodos muito sensíveis e específicos que utilizam complexos antígeno-anticorpo ⁶⁵. Dois tipos de técnicas que são muito utilizadas são a imunofluorescência directa que permite a visualização de imunocomplexos e depósitos complementares em tecidos congelados; e o método avidina-biotina que permite a detecção de antígenos celulares em cortes de tecido, tecidos congelados e esfregaços de células ⁶⁵.

A imunofluorescência é uma técnica rápida que consiste na aplicação de um anticorpo fluorescente num corte histológico, que se deixa incubar durante 30 minutos. Posteriormente, lava-se e observa-se ao microscópio de luz UV. Todos os anticorpos que se ligaram ao antigénio específico vão aparecer sob a forma de áreas verdes fluorescentes ⁶⁵.

O outro método envolve a ligação de um anticorpo primário para o antigénio de interesse, e depois a visualização do anticorpo ligado através de um sistema indirecto avidina-biotina associado a um produto enzimático (anticorpo secundário que reconhece o anticorpo primário) ^{65,71}. Este método fornece excelente sensibilidade e um bom desempenho nas aplicações imunohistoquímicas ⁶⁵.

A imunohistoquímica é muito utilizada para efeitos de diagnóstico e prognóstico, sendo importante a sua padronização para resultados confiáveis e reprodutíveis ⁶⁸. A imunohistoquímica pode ser afectada por diversos factores, incluindo os pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos, resultando em pouca reprodutibilidade, consistência variável e variabilidade inter-laboratorial ⁶⁸. Apesar de grandes dificuldades, foram feitos esforços no sentido de padronizar o diagnóstico imunohistoquímico e várias sugestões, soluções e regras com processos de fixação, processamento e análise foram padronizados ⁶⁸.

Embora a introdução de reagentes mais sensíveis e sistemas de detecção automáticos tenham aumentado consideravelmente a reprodutibilidade e consistência das técnicas imunohistoquímicas, a padronização ainda se encontra aquém do que seria desejado ⁶⁸.

Patologia Endócrina e Modelos Experimentais

A manipulação das patologias endócrinas requer conhecimentos de várias áreas, tais como o metabolismo intermediário, a fisiologia reprodutiva, o metabolismo ósseo e o crescimento. A prática de endocrinologia está intimamente relacionada com a compreensão da secreção hormonal, a sua acção e os princípios de controlo. As patologias endócrinas mais comuns são o hipertiroidismo e a diabetes mellitus ¹.

Hipertiroidismo

A tiróide produz duas hormonas, a tiroxina (T4) e a tri-iodotironina (T3). A tri-iodotironina é a mediadora da acção da tiróide na célula. As funções destas duas hormonas são qualitativamente idênticas. No entanto, diferem quanto à rapidez e à intensidade de acção ⁵. A tri-iodotironina é quatro vezes mais potente que a tiroxina, mas está presente no sangue em quantidade menor e aí persiste por um período muito mais curto de tempo do que a tiroxina ⁵. A ausência completa da secreção tiroideia geralmente faz com que o metabolismo basal fique cerca de 40 a 50% abaixo do normal, ao passo que excessos extremos de secreção tiroideia podem fazer com que o metabolismo basal fique até 60 a 100% acima do normal ⁵. A secreção da tiróide é controlada principalmente pela hormona estimulante da tiróide, segregada pela hipófise anterior ⁵. As hormonas tiroideias têm como função regular a energia e o calor, facilitar o desenvolvimento saudável do sistema nervoso central, o crescimento somático e a puberdade. São ainda responsáveis pela regulação da síntese de proteínas importantes para a função hepática, cardíaca, neurológica e muscular ^{2,4,7,8,9}.

A nível do músculo esquelético, um ligeiro aumento das hormonas da tiróide faz com que os músculos reajam de forma energética. Mas, quando a quantidade de hormona de torna excessiva, os músculos enfraquecem em virtude do acentuado catabolismo proteico ⁵. Um dos sinais mais característicos do hipertiroidismo é o tremor muscular fino, que é causado pela maior reactividade das sinapses neuronais na área da medula, que controlam o tónus muscular ⁵.

Na maioria dos doentes com hipertiroidismo, a tiróide aumenta até duas a três vezes o seu tamanho normal, com elevado pregueamento do revestimento das células foliculares no interior dos folículos, de modo que o número de células aumenta várias vezes, a par do tamanho da glândula. Além disso, cada célula aumenta diversas vezes a intensidade da sua secreção ⁵.

No hipertiroidismo os tecidos encontram-se expostos a grandes quantidades de hormonas tiroideias. A tirotoxicose é o termo clássico para descrever a aparência dos doentes afectados, que apresentam taquicardia, sudorese e temperatura corporal

aumentada. Alguns especialistas restringiram o termo hipertiroidismo à doença na qual a glândula tiróide sintetiza e segrega uma quantidade excessiva de hormona. O termo tirotoxicose passou a ser utilizado para referir situações em que existe grande quantidade de hormonas tiróideias em circulação, independentemente da causa ^{2,3}.

O hipertiroidismo pode resultar de várias situações. A doença de Graves, uma patologia autoimune causada pela estimulação dos receptores de tirotropina por anticorpos é a principal causa na maioria dos doentes. O desenvolvimento de um ou mais nódulos com funcionamento autónomo da tiróide, que produzem quantidades excessivas de hormona tiróideia, também é um problema comum. Menos comuns são as várias formas de tiroidite, na qual a inflamação da tiróide danifica os folículos, resultando numa libertação desregulada de hormona na circulação sanguínea ^{2,3,4}.

Os sintomas típicos do hipertiroidismo indicam a acção excessiva das hormonas nas células, bem como a actividade β -adrenérgica reforçada. Os doentes normalmente apresentam fadiga, nervosismo ou ansiedade, perda de peso, dificuldade em dormir, palpitações e hipersensibilidade ao calor. As mulheres podem apresentar menstruações irregulares e diminuição da fertilidade. Os homens por sua vez, podem ter diminuição da líbido e por vezes ginecomastia dolorosa. Os achados clínicos quase sempre incluem taquicardia, pele húmida e quente, a presença de um aumento do tamanho da tiróide e tremores ligeiros. Os indivíduos mais velhos apresentam menos sinais e sintomas que os mais novos, incluindo uma baixa taxa de bócio e uma alta prevalência de manifestações cardíacas como a fibrilhação arterial, e, mais raramente a paragem cardíaca congestiva. Outros indicadores de hipertiroidismo incluem osteoporose, hipercalcémia, paragem cardíaca congestiva, fibrilhação arterial ou contracções arteriais prematuras, dificuldades respiratórias, fraqueza muscular, ansiedade e amenorreia. Em doentes idosos, a perda de peso pode ser acompanhada por anorexia ao invés de ingestão calórica excessiva, levantando muitas vezes pesquisas extensivas, dispendiosas e, em última instância, pautadas pelo insucesso, pois visam procurar doenças malignas ^{2,4,5}. Muitas pessoas com hipertiroidismo, embora não todas, apresentam exoftalmia ⁵.

O hipertiroidismo pode ainda apresentar-se como uma crise aguda, designada por alguns autores de "tempestade tiroideia", uma situação que coloca a vida em risco com sinais de taquicardia que pode evoluir para fibrilhação ventricular, paragem cardíaca congestiva, hiperpiréxia, agitação, psicose e coma. Este evento ocorre mais frequentemente após a ocorrência de factores precipitantes, tais como situações de trauma, parto, infecção ou cirurgia invasiva em doentes diagnosticados com hipertiroidismo ².

A tri-iodotironina (T3) estimula a taxa metabólica com o aumento concomitante do consumo de fontes energéticas ⁶. Os músculos esqueléticos respondem com grande

plasticidade às mudanças do estado da tiróide (hipotiroidismo e hipertiroidismo). A sua resposta implica uma remodelação citoarquitatural e características metabólicas individuais dos miócitos em consonância com a utilização de fontes de energia ⁶. Isto é particularmente verdade para os músculos com fibras mistas, como o gastrocnémio ⁶. Para aumentar a taxa metabólica do músculo esquelético, a T3 estimula a utilização de lípidos, bem como de hidratos de carbono ⁶. No hipertiroidismo, taxas relativamente elevadas de utilização de glicose podem ser mantidas no músculo, apesar da concomitante taxa elevada de circulação de derivados de lípidos e da supressão significativa da oxidação do piruvato ⁶.

Em adição a esta actividade metabólica, a hormona T3 afecta os processos de desenvolvimento, e é considerada o maior regulador *in vivo* do desenvolvimento muscular ^{11,12}.

Esta hormona não só estimula o crescimento deste tecido através do aumento do número e diâmetro das fibras musculares, como também regula a transição entre isoformas de miosina neonatal e adultas, bem como influencia as propriedades contrácteis das fibras musculares adultas ¹¹.

Diabetes Mellitus

A Diabetes Mellitus (DM) refere-se a um grupo comum de desordens metabólicas. Existem vários tipos distintos de DM e são causados por uma interacção complexa entre factores genéticos e ambientais. Dependendo da etiologia da DM, os factores que contribuem para a hiperglicémia incluem a reduzida secreção de insulina, a diminuição da utilização de glicose e o aumento da produção de glicose. A desregulação metabólica associada à DM causa alterações fisiológicas secundárias em múltiplos sistemas de órgãos que conduz à sua disfunção ou falência ^{10,14}.

A DM pode apresentar sintomas característicos como polidipsia (sede), poliúria (aumento do volume urinário), visão turva e perda de peso, normalmente quando os valores de glicose no sangue são > 250mg/dl ¹⁴. Os doentes hiperglicémicos podem não ter sintomas e consequentemente possuir hiperglicémia suficiente para causar mudanças patológicas e funcionais algum tempo antes do correcto diagnóstico da doença ¹⁴.

Os efeitos a longo prazo da DM o incluem desenvolvimento progressivo de complicações específicas, tais como retinopatia com potencial cegueira, nefropatia que pode conduzir mesmo à falência renal, e neuropatias ¹⁴. Os doentes diabéticos têm risco aumentado de doenças cardiovasculares, vasculares periféricas e cerebrovasculares ¹⁴. A combinação de

micro e macro angiopatias conduz a um alto risco de desenvolvimento de úlceras indolores nas extremidades, sobretudo inferiores, e em muitos casos complicações que podem obrigar à amputação ¹⁴.

A DM é classificada de acordo com o processo patogénico que leva à hiperglicémia, em oposição aos critérios anteriores, como a idade de início ou o tipo de tratamento. Ambos os tipos de diabetes são precedidos por uma fase de homeostase da glicose, que com o tempo progride. Existem várias formas de DM, mas apenas nos iremos debruçar sobre a DM tipo I e tipo II, que são as mais frequentes ^{10,14}.

A DM tipo I resulta da completa ou quase total deficiência de insulina. A DM tipo II, por sua vez, é um grupo heterogéneo de doenças caracterizadas por graus variáveis de resistência à insulina, diminuição da secreção de insulina ou aumento da produção de glicose ¹⁰. A DM tipo II é precedida por um período de níveis de glicose anormais, classificada como glicémia de jejum alterada (IFG) ou tolerância diminuída à glicose (IGT) ¹⁰.

Os termos diabetes mellitus insulino-dependente e diabetes mellitus não - insulino-dependente não são actuais à luz da nova forma de classificação da diabetes mellitus, uma vez que os indivíduos com DM tipo II, eventualmente requerem tratamento com insulina para controlo da glicémia. Também a idade não constitui um critério para a classificação. Apesar da DM tipo I se desenvolver mais comumente antes dos 30 anos, os processos auto-imunes destrutivos de células β podem desenvolver-se em qualquer idade. Estima-se que entre 5 a 10% dos indivíduos que desenvolvem DM após os 30 anos têm DM tipo I. Da mesma forma, a DM tipo II que se desenvolve, tipicamente, com o aumento da idade, está a ser agora diagnosticada mais frequentemente em crianças e adultos jovens, especialmente em adolescentes obesos ¹⁰.

Outras etiologias para a DM incluem defeitos genéticos específicos na acção ou secreção de insulina, alterações metabólicas que comprometem a secreção de insulina, anormalidades mitocondriais e uma série de condições que prejudicam a tolerância à glicose ¹⁰.

A DM tipo I resulta da interacção de factores genéticos, ambientais e imunológicos que conduzem à destruição das células β do pâncreas e à deficiência de insulina. Os indivíduos com susceptibilidade genética possuem uma massa de células β normal aquando do nascimento, mas começam a perdê-las secundariamente à destruição auto-imune que ocorre ao longo de meses ou anos. Pensa-se que este processo auto-imune é desencadeado por um estímulo infeccioso ou ambiental e sustentado por uma molécula específica para células β , resultando numa deficiência absoluta de insulina ^{10,14,37}. Na

maioria dos indivíduos os marcadores imunológicos aparecem depois do início do processo, mas antes da diabetes se tornar clinicamente evidente. A massa de células β começa a diminuir, e a secreção de insulina torna-se progressivamente diminuída, embora a tolerância à glucose normal seja mantida. A taxa de diminuição da massa das células β varia entre indivíduos; em alguns doentes evolui rapidamente para diabetes diagnosticável clinicamente, noutros tem evolução mais lenta. As características da diabetes só se observam quando a maioria das células β são destruídas ($\approx 80\%$). Neste ponto, apesar de ainda existirem células β funcionais, estas são em número insuficiente para manter a tolerância à glicose. Após a manifestação clínica da DM tipo I, pode surgir uma fase durante a qual o controlo da glicémia é feito através da administração de doses baixas de insulina, ou mais raramente, pode nem sequer ser necessária. No entanto, esta situação é transitória, e a produção endógena de insulina, pelas células β vai desaparecendo à medida que o processo auto-imune as vai destruindo, tornando-se o indivíduo completamente deficiente em insulina ^{10,14}.

A resistência à insulina e a secreção anormal desta são fundamentais para o desenvolvimento de DM tipo II. A maioria dos estudos defende que a resistência à insulina provém de um defeito da sua secreção, mas que a diabetes só se desenvolve quando a secreção de insulina é insuficiente ^{10,13,16}.

A DM tipo II é a forma mais prevalente de DM (90% dos doentes com DM) e caracteriza-se pela secreção de insulina insuficiente, resistência à insulina, produção excessiva de glicose hepática e metabolismo anormal das gorduras ¹². A obesidade, particularmente a visceral ou central (da zona abdominal) é muito comum na DM tipo II. No início da doença, a tolerância à glucose permanece quase normal, apesar de existir resistência à insulina, já que as células β do pâncreas compensam a resistência periódica com o aumento da produção de insulina, até à exaustão ^{10,13,14,15,16}.

O risco de desenvolver DM tipo II aumenta com a idade, obesidade e ausência de exercício físico. Ocorre mais frequentemente em mulheres com antecedente de diabetes gestacional e em indivíduos com hipertensão ou dislipidémia, estando sempre associada com uma predisposição genética familiar, mas que ainda não se encontra claramente definida ^{14,15,16}.

Na DM tipo II os dois órgãos mais afectados pela resistência à insulina são o fígado e o músculo esquelético ¹³. O músculo esquelético é responsável pela maior parte ($> 80\%$) da distribuição de glucose corporal libertada por estímulo insulínico ¹³. A capacidade metabólica do músculo esquelético resistente à insulina parece ser organizada para a esterificação lipídica ao invés da oxidação lipídica ¹³. Um desequilíbrio entre a absorção de ácidos gordos e a oxidação destes pode conduzir a uma acumulação de gordura no

interior do músculo esquelético, o que contribui para a indução da resistência à insulina e o aparecimento de um quadro de DM tipo II ^{13,15}.

Modelos Experimentais para o Estudo do Hipertiroidismo

Os modelos animais são utilizados há vários anos na pesquisa biomédica do hipertiroidismo, não sendo possível substituí-los por modelos *in vitro*. Os modelos *in vivo*, em animais de laboratório, são importantes para o estudo das alterações que o hipertiroidismo provoca nos vários órgãos, tais como o coração, o fígado, o músculo e o cérebro, bem como no estudo de fármacos que são capazes de normalizar os valores de hormonas tiróideias. Os modelos experimentais permitem a utilização de métodos que não podem ser utilizados em humanos, por questões éticas.

Para se utilizar modelos animais no estudo de doenças humanas, é necessário existir relação entre a espécie humana e os animais em que se desenvolve o estudo experimental. Sabe-se que o desenvolvimento embrionário da maioria dos mamíferos é semelhante ao dos humanos. No entanto, é necessário compreender que a leitura dos resultados depende da espécie escolhida. Convém ainda reter que os modelos experimentais são modelos, e como tal, apenas permitem retirar conclusões que devem poder ser extrapolados para a espécie humana.

Os modelos animais mais utilizados na pesquisa do hipertiroidismo são desenvolvidos com o objectivo de compreender os mecanismos patogénicos, ao nível morfológico e molecular, e utilizam normalmente pequenos animais de laboratório, nomeadamente as várias estirpes de rato.

São descritos na literatura científica vários modelos animais que possibilitam o estudo do hipertiroidismo, como os efeitos no sistema cardiovascular e renal, no crescimento e no metabolismo, na maturação cerebral e na função gastrointestinal ^{72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86}.

Existem vários métodos de induzir o hipertiroidismo experimental, um dos quais é através da administração de água suplementada com hormonas tiróideias. Exemplo deste método é um modelo experimental executado por Broedel ⁷⁴ com o objectivo de determinar os efeitos da concentração de hormonas em regiões cerebrais específicas. Para a indução do hipertiroidismo recorreu a ratos Sprague-Dawley macho, aos quais forneceu água de bebida com hormona T4 (24 µg/30ml de água) diariamente, durante 4 semanas. Verificou que a concentração de T4 no tecido cerebral encontrava-se aumentada em todas as regiões estudadas ⁷⁴.

No modelo utilizado por Branvold ⁸⁵ com o objectivo de estudar algumas das vias de sinalização básicas responsáveis pelo efeito do excesso de hormona tiróideia na biogénese mitocondrial, foi utilizado o rato Sprague-Dawley. A ração foi comida pulverizada com 3 mg de tiroxina e 1 mg de 3,5,3'-triiodotironina por kg, durante 4

semanas. O autor verificou que teve sucesso na obtenção de hipertiroidismo experimental, e que as hormonas tiróideias desempenham um papel importante na regulação das vias estudadas ⁸⁵.

O hipertiroidismo experimental também pode ser induzido através da injeção sub-cutânea ^{77,78,79,83,84} ou intra-peritoneal ^{75,80,81,82} de hormonas. Bussemaker ⁷⁵, com o objectivo de estudar a influência das hormonas tiróideias no relaxamento do endotélio da artéria renal, recorreu a ratos Wistar-Kyoto macho, nos quais injectou diariamente e intra-peritonealmente, durante 8 semanas triiodotironina (300 µg/kg dissolvido numa solução de 1% de Carbonato de sódio). O autor observou a influência que o hipertiroidismo exerce sobre o relaxamento do endotélio da artéria renal através de dois mecanismos diferentes: via AMP cíclico e NO ⁷⁵. Honda ⁷⁷, por sua vez, para estudar alterações nas respostas mediadas por receptores adrenérgicos e muscarínicos injectou sub-cutâneamente ratos Wistar-Imamichi com T4 (0,5mg/kg dissolvido em solução salina) durante 3 dias. O autor concluiu que o hipertiroidismo foi induzido com sucesso e que a vasoconstrição induzida pela noradrenalina diminui em ratos tratados com T4 ⁷⁷.

Existe outro método de induzir hipertiroidismo experimental, através de gavagem ⁸⁶. Mitasiková ⁸⁶ pretendeu estudar a influência da diabetes e das hormonas tiroideias na expressão da conexina-43 e PKC-ε no *atria* do coração. Para tal, recorreu a ratos Wistar-Kyoto macho, nos quais induziu diabetes através de uma injeção única de estreptozotocina (50 mg/kg). Para a indução do hipertiroidismo administrou por gavagem em ratos diabéticos e não diabéticos triiodotironina (10 µg/100g/dia) durante 10 dias. O autor observou um aumento da expressão de conexina-43 na diabetes e no hipertiroidismo ⁸⁶.

Contribuição Pessoal

Nota Introdutória e Objectivos do Estudo

O sistema endócrino é responsável pela regulação e coordenação das actividades celulares em todo o corpo, para além de também ser responsável pelo seu crescimento e desenvolvimento.

As hormonas da tiróide participam em vários sistemas do organismo, sendo um deles o muscular.

Sabendo de antemão que os efeitos a nível molecular se manifestam primeiro que os morfológicos, este modelo experimental tem como objectivo avaliar o perfil metabólico dos músculos mastigadores normais (temporal), para posterior estudo de alterações decorrentes do hipertiroidismo experimental.

Material e Métodos

Preparação dos animais

No estudo foram utilizados 16 ratos da estirpe Wistar, com 8 semanas de idade no início do ensaio, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Antes de iniciar o estudo, todos os animais foram submetidos a um período de quarentena de uma semana.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente por dois grupos com igual número de elementos: o grupo controlo (Grupo CTRL 1) e o grupo teste (Grupo TST 2), cada um dos quais com 8 animais cada. Os animais de cada grupo foram distribuídos por gaiolas com três indivíduos.

Protocolo de Indução do Hipertiroidismo

O fármaco utilizado para a indução de um hipertiroidismo sub-agudo foi a levotiroxina injectável.

Os animais do grupo teste foram submetidos à administração de levotiroxina três vezes por semana na dose de 250mg/kg de peso corporal, por gavagem, durante 2 semanas.

Manutenção dos animais

Os ratos foram mantidos nas condições padrão do biotério: temperatura de 22°C e 60-65% de humidade, com regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os dois grupos, teste e controlo, foram mantidos com água e ração *ad libitum* durante duas semanas, findas as quais foram sacrificados todos os animais.

A vigilância para rastreio de alterações patológicas foi diária. A pesagem foi realizada diariamente, coincidindo a última pesagem com a hora do sacrifício.

Sacrifício, Colheitas e Registos

Todos os animais que chegaram ao fim da experiência foram eutanasiados e necropsiados. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical.

Na necrópsia foram registados os dados referentes à observação do hábito externo, observação detalhada do hábito interno e fragmentos de tecidos colhidos e respectiva finalidade, em modelo próprio em utilização no Instituto de Patologia Experimental.

Foram colhidos fragmentos dos músculos masseter e temporal para fixação com etanol a 70% e formaldeído tamponado a 10%. Em todos os animais foram colhidos dois fragmentos de fígado, da tiróide e dos músculos masseter e temporal para congelação rápida em azoto líquido e posterior conservação a -70°C.

Histopatologia, Histoquímica e Histoenzimologia

Todos os fragmentos colhidos para histopatologia de rotina foram incluídos em parafina e foram realizados cortes de micrótomos. Destas amostras foi feito o estudo histológico de rotina, usando a metodologia padrão para coloração de Hematoxilina e Eosina.

Metabolómica

Os fragmentos de tecido muscular foram colocados à temperatura ambiente para a realização de cortes que permitissem ter amostras com uma massa média de 30mg. Os tecidos foram colocados nos rotores, preenchidos com D2O para permitir uma rotação constante de cada amostra. A espectroscopia de alta resolução com sonda 1H (*high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy* – HRMAS) foi realizada num espectrómetro Tesla Varian 14.1 (Varian NMR Inc) com uma consola informática com o

software VNMRj para aquisição gráfica dos espectros. A temperatura da sonda foi mantida a 20°C e a rotação máxima da amostra a 3500 Hz.

Para cada amostra foram realizados 128 scans, com um tempo de aquisição total médio de 10 minutos.

A análise dos espectros com recurso ao software Nuts permitiu a observação da variação de cada um dos metabolitos em análise e colheita de dados sobre o comportamento geral dos espectros nas diversas amostras do grupo muscular estudado em todos os indivíduos (temporal).

Análise Histopatológica e Morfométrica

Para cada músculo masseter e temporal de cada indivíduo, foram realizadas 10 fotografias dos cortes histopatológicos transversais corados com Hematoxilina e Eosina, utilizando os padrões esterológicos de aquisição de imagem, com padronização da aleatorização dos campos fotografados.

A análise morfométrica foi realizada com o auxílio do programa desenvolvido pelos Institutos Nacionais de Saúde (EUA), Image J 1.42q, que permitiu a medição da área de secção das fibras musculares em corte transversal.

Assim, a variação deste parâmetro pode ser descrita utilizando a média, desvio padrão e coeficiente de variação. Com base nestes dados definem-se para o grupo controlo sem patologia, e para cada um dos músculos estudados, cinco tipos de fibras musculares, de acordo com as secções observadas: fibras muito pequenas, fibras pequenas, fibras médias, fibras grandes e fibras muito grandes. Designamos de fibras médias aquelas cuja área se encontra compreendida no intervalo [média-SD, média+SD]. Designamos fibras grandes, aquelas cujo valor da área se encontra incluído no intervalo [média+SD, média+2SD]. Designamos fibras pequenas, quando o valor da área está incluído no intervalo [média-SD, média-2SD]. Consideramos que as fibras musculares são muito pequenas, quando o valor da sua área se encontra abaixo do considerado como fibras pequenas, e as fibras são consideradas como muito grandes quando a sua área excede a área das fibras grandes.

Resultados

Análise Morfométrica

Grupo Controlo

No grupo controlo observa-se uma distribuição uniforme das fibras musculares em corte transversal, com preservação dos feixes.

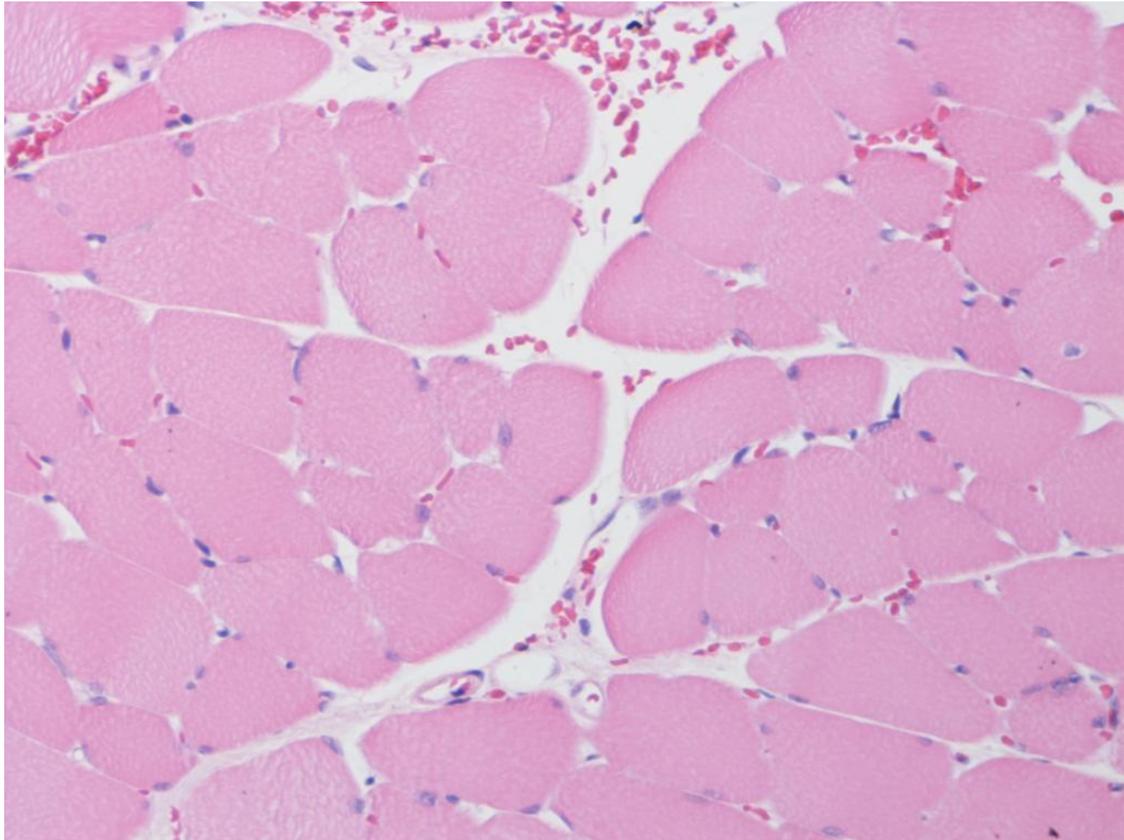


Figura n.º 01. Microfotografia de um corte de músculo masseter do grupo controlo. HE, 100X no original.

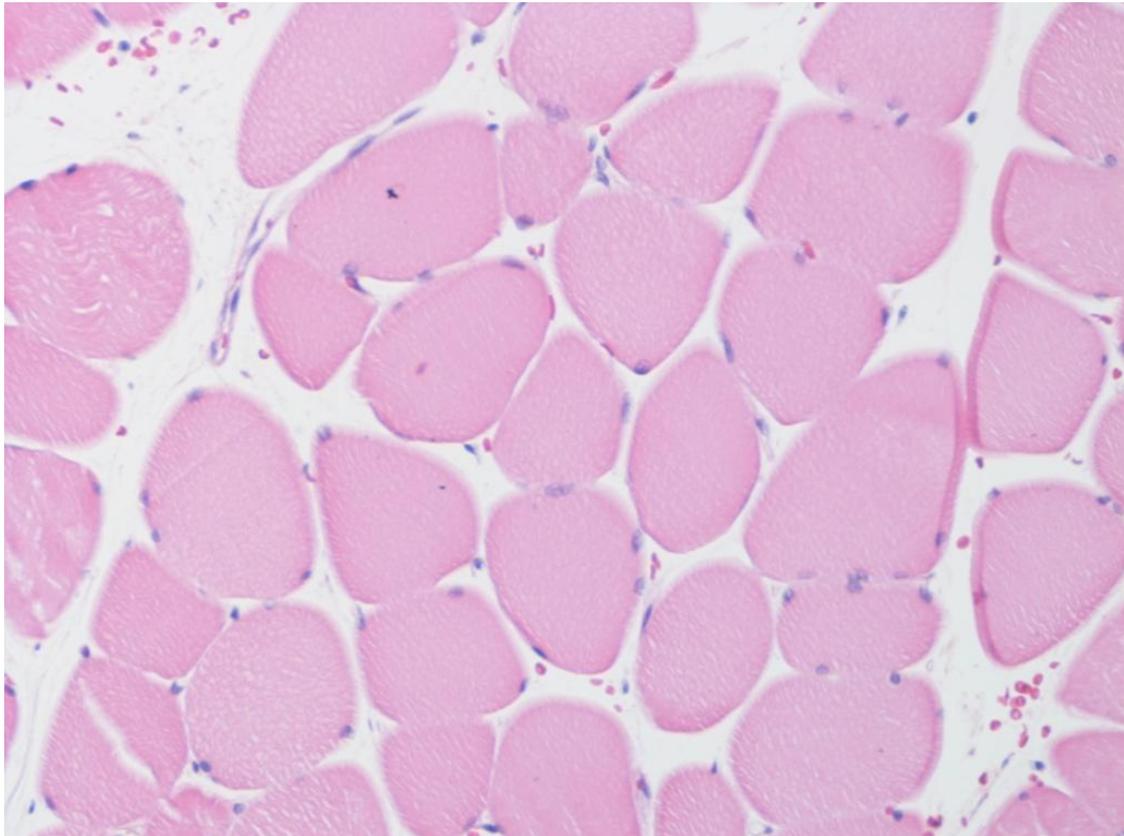


Figura n.º 02. Microfotografia de um corte de músculo temporal do grupo controlo. HE, 100X no original.

A determinação da área ocupada por cada uma das fibras de cada um dos músculos, em corte transversal, mostrou para o músculo masseter que esta área tinha um valor de $10\,704 \pm 6\,835$ px, variando entre 3 869 e 17 539 px, para um intervalo de confiança de 95%.

Tendo em consideração as cinco classes referidas anteriormente para descrever a área ocupada por cada uma das fibras musculares em corte transversal, verifica-se que não se observam casos de fibras muito pequenas; 7,32% das fibras medidas são pequenas; 80,49% das fibras medidas são médias; 7,32% das fibras medidas são grandes e 7,32% das fibras medidas são muito grandes.

A determinação da área ocupada por cada uma das fibras do músculo temporal, em corte transversal, mostrou que esta área tinha um valor de $7\,211,32 \pm 2\,864,38$ px, variando entre 4 347 e 10 075 px, para um intervalo de confiança de 95%.

Considerando também as cinco classes referidas para descrever a área ocupada por cada uma das fibras musculares em corte transversal, verifica-se que não existem fibras musculares muito pequenas; 17,07% são pequenas; 70,73% das fibras medidas são médias; 9,76% das fibras medidas são grandes e 2,44% das fibras medidas são muito grandes.

Grupo Teste

No grupo teste observa-se uma distribuição uniforme das fibras musculares em corte transversal, com preservação dos feixes. Não se observam quaisquer tipos de alterações histológicas, o que inclui a ausência de necrose, hemorragia, infiltrado inflamatório ou de focos de degenerescência.

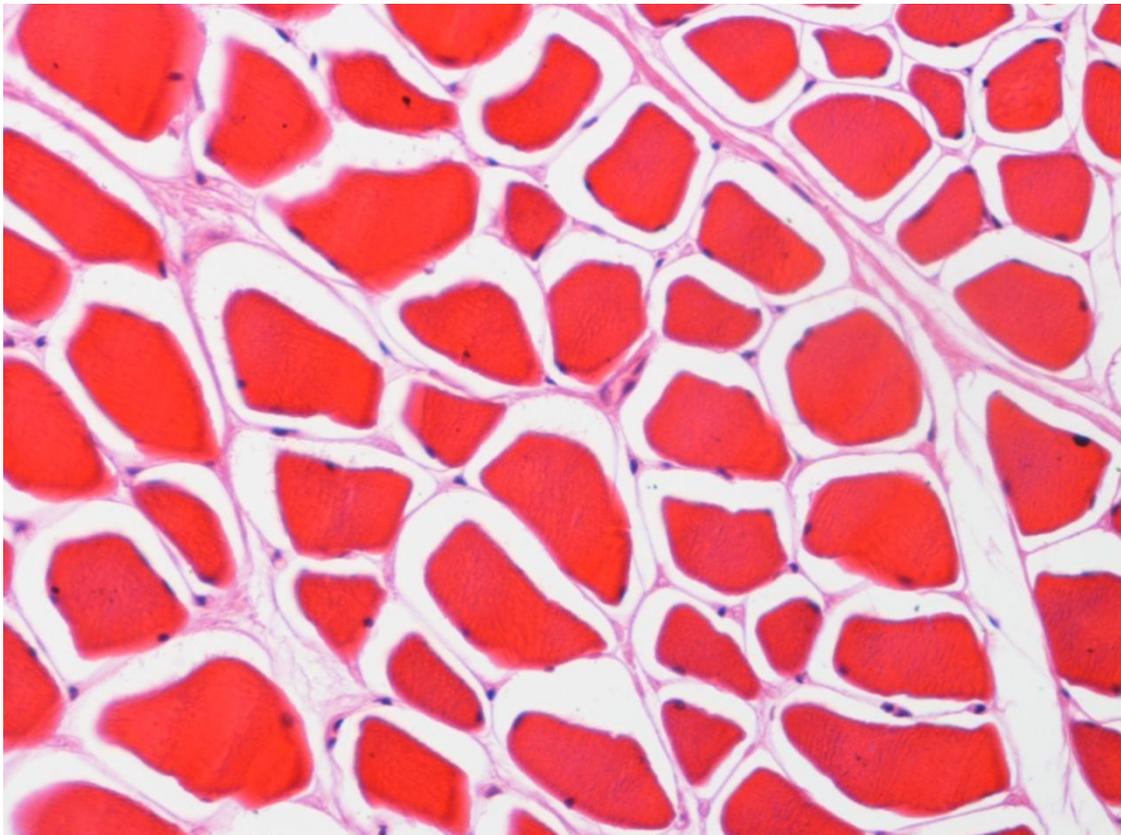


Figura n.º 03. Microfotografia de um corte de músculo masseter do grupo teste, sem qualquer sinal evidente de lesão morfológica. HE, 100X no original.

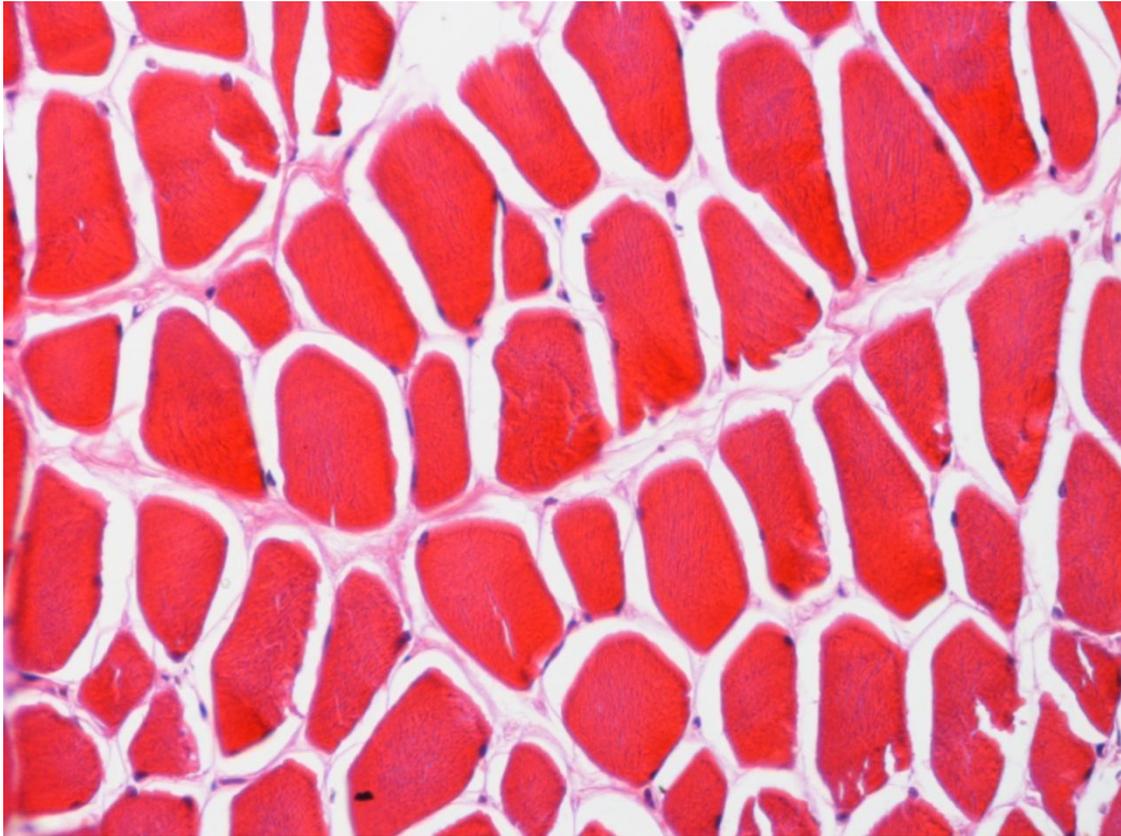


Figura n.º 04. Microfotografia de um corte de músculo temporal do grupo teste, sem qualquer sinal evidente de lesão morfológica. HE, 100X no original

A determinação da área ocupada por cada uma das fibras de cada um dos músculos, em corte transversal, mostrou para o músculo masseter que esta área tinha um valor de $13\,620 \pm 5\,013,97$ px, variando entre 8 607 e 18 635 px, para um intervalo de confiança de 95%.

Considerando também as cinco classes referidas para descrever a área ocupada por cada uma das fibras musculares em corte transversal, verifica-se que não se observam casos de fibras muito pequenas; 2,44% das fibras medidas são pequenas; 78,05% das fibras medidas são médias; 18,29% das fibras medidas são grandes e 1,22% das fibras medidas são muito grandes.

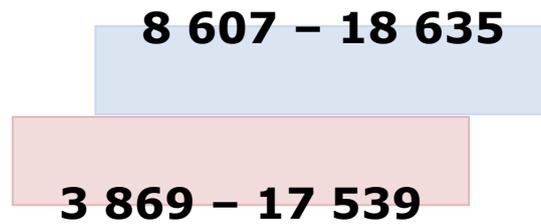


Figura n.º 05. Representação esquemática da área das fibras musculares em corte transversal no músculo masseter (a azul encontra-se representado o grupo teste e a rosa encontra-se representado o grupo controlo).

A determinação da área ocupada por cada uma das fibras do músculo temporal, em corte transversal, mostrou que esta área tinha um valor de $21\,826 \pm 12\,020$ px, variando entre 9 806 e 33 846 px, para um intervalo de confiança de 95%.

Considerando as cinco classes referidas para descrever a área ocupada por cada uma das fibras musculares em corte transversal, verifica-se que não existem fibras musculares muito pequenas nem pequenas; 10% das fibras medidas são médias; 7,14% das fibras medidas são grandes e 82,86% das fibras medidas são muito grandes.

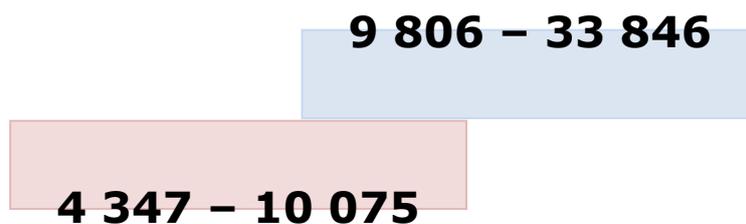


Figura n.º 06. Representação esquemática da área das fibras musculares em corte transversal no músculo temporal (a azul encontra-se representado o grupo teste e a rosa encontra-se representado o grupo controlo).

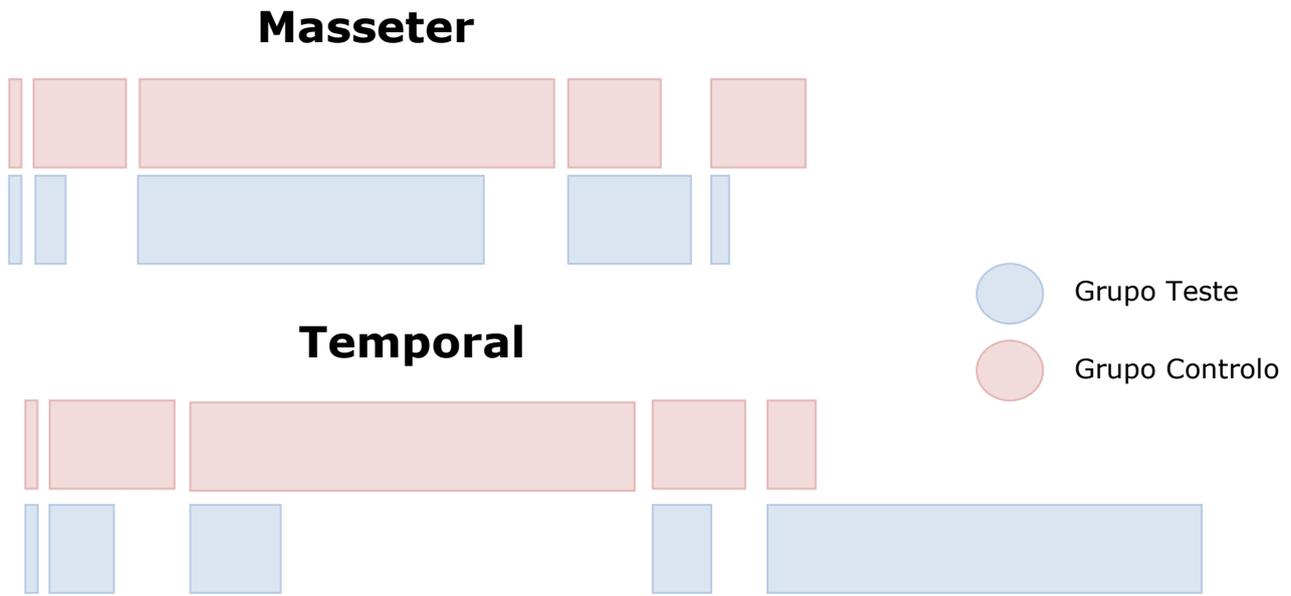


Figura n.º 07. Representação esquemática da distribuição das fibras musculares em corte transversal dos músculos mastigadores masseter e temporal (a azul encontra-se representado o grupo teste e a rosa encontra-se representado o grupo controle)

Análise Metabólica

A observação dos espectros obtidos permitiu a caracterização de alguns dos metabolitos considerados como chave no metabolismo do tecido muscular, no sentido de servir de referência na análise e comparação dos espectros do grupo teste e controlo.

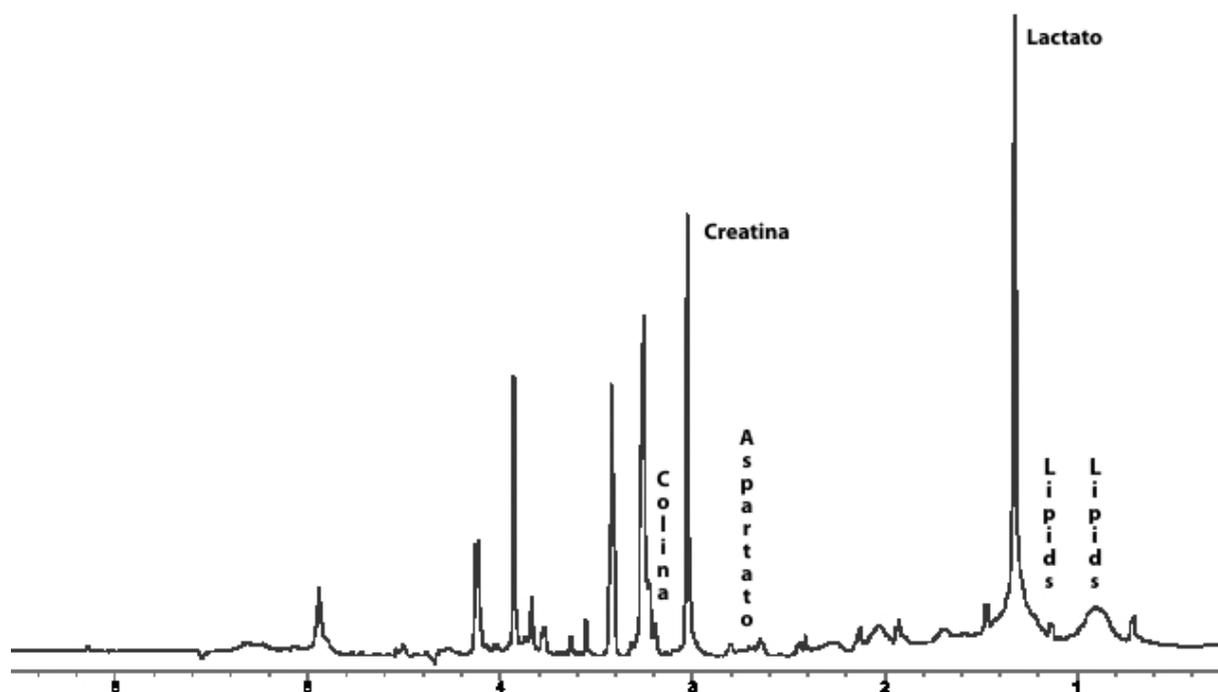


Figura n.º 08. Espectro obtido para o músculo temporal (grupo controlo).

A análise estatística dos picos assinalados permitiu observar que: o aspartato tem uma intensidade de cerca de $223\,123,37 \pm 192\,858,06$; a colina tem uma intensidade de $15\,445,58 \pm 13\,690,47$; a creatina tem uma intensidade de $299\,264,59 \pm 280\,257,97$; o lactato tem uma intensidade de $423\,549,06 \pm 368\,867,95$; e os lípidos apresentam-se com uma intensidade de $25\,252,75 \pm 24\,778,35$ e $45\,421,16 \pm 42\,121,30$.

Discussão

Os músculos mastigadores são constituídos por músculo esquelético. Este é constituído por feixes de células cilíndricas muito longas e multinucleadas, que apresentam estriações transversais, e as suas fibras têm contracção rápida e vigorosa, sujeita a controlo voluntário ³⁴.

As fibras musculares também apresentam uma estrutura complexa, pois estas quando observadas ao microscópio óptico, mostram estriações transversais, pela alternância de feixes claros e escuros ³⁴. Estas também podem ser de dois tipos: fibras de contracção lenta ou fibras de contracção rápida. Ambos os tipos de fibras estão presentes nos músculos da mastigação, sendo que as fibras de contracção lenta representam uma pequena parte das fibras dos músculos mastigadores ³⁶.

Muitas das doenças no ser humano resultam em mudanças específicas no perfil bioquímico e químico dos tecidos e fluidos biológicos, pelo que, a medição directa das expressões proteicas e metabólicas irá fornecer dados preciosos quer do estado de saúde, quer do estado de doença, permitindo assim a identificação das causas das doenças ²⁹. Para tal, é necessário recorrer aos vários instrumentos de análise molecular disponíveis, como a metabolómica, a genómica, a proteómica e a imunohistoquímica.

A análise metabolómica consiste na identificação e quantificação dos metabolitos presentes na amostra do grupo teste, e do grupo controlo e sua posterior comparação ^{17,18,19,22,29}. Esta pode ser efectuada através de NMR ou MS simples ou combinada com LS ^{17,21,26,27,28,32,33}.

Por sua vez, a genómica consiste no estudo do genoma dos organismos, sendo a ferramenta mais importante desta técnica os *microarrays* de DNA ⁶¹.

A proteómica define-se como o estudo de todas as proteínas produzidas pelas células de um dado organismo, o que permite a determinação do seu papel nas funções fisiológicas e fisiopatológicas ^{38,46,70}. Para proceder à determinação do proteoma é necessário recorrer a géis de electroforese uni ou bi-dimensionais ou cromatografia líquida para proceder à separação das proteínas, e a espectroscopia de massa para a sua identificação ^{38,39,69}.

A imunohistoquímica, por outro lado, recorre a anticorpos monoclonais ou policlonais para detectar antigénios específicos em cortes de tecido ⁶⁴. Esta técnica pode ser efectuada através da utilização do método de imunofluorescência directa ou método avidina-biotina ⁶⁵.

O sistema endócrino é responsável por regular e coordenar actividades celulares de todo o organismo, pelo que qualquer perturbação neste irá acarretar repercussões a vários níveis ⁴⁴.

O hipertiroidismo caracteriza-se pelo aumento da síntese e secreção de hormonas por parte da tiróide ^{2,3}. Os sintomas típicos do hipertiroidismo reflectem a acção excessiva das hormonas nas células, pelo que os doentes normalmente apresentam taquicardia, sudorese, nervosismo ou ansiedade e tremores (devido ao aumento das hormonas da tiróide, os músculos reagem de forma energética, o que aumenta o número de sinapses neuronais na área da medula, responsável pelo controlo do tónus muscular) ⁵.

A hormona T3 (triiodotironina), produzida pela tiróide, é considerada o maior regulador *in vivo* do desenvolvimento muscular. Estimula não só o crescimento do tecido muscular, como também influencia as propriedades contrácteis das fibras musculares adultas ^{11,12}.

Na literatura consultada foram referidos vários modelos experimentais para o estudo do efeito do hipertiroidismo nos vários sistemas e órgãos do organismo. Os modelos *in vivo* como espécie de laboratório o rato, mas recorrem a estirpes diferentes. Há diferenças nos grupos experimentais, na hormona utilizada e sua concentração, no modo e duração da sua administração, e nos períodos de exposição ^{74,75,77,85,86}.

No presente estudo recorreremos à administração de levotiroxina na concentração de 250mg/kg de peso corporal, através de gavagem.

A análise morfométrica do músculo masseter indica-nos um ligeiro aumento da área das fibras musculares, sem significado estatístico, provavelmente à custa do aumento da área ocupada pelas fibras grandes e diminuição dos restantes tipos de fibras. O músculo temporal, por sua vez apresenta resultados estatisticamente significativos, pois verifica-se um aumento da área ocupada pelas fibras, principalmente das fibras muito grandes (ver **figura n.º 07**), pelo que se torna aliciante o estudo desta situação a nível molecular.

Esta análise foi objecto de apresentação em poster com o título "Morphometric Evaluation of Masticatory Muscles After Experimental Hyperthyroidism Induction", no congresso internacional Experimental Biology 2010 em Anaheim, CA, EUA.

Com vista a proceder ao estudo molecular do músculo temporal procedemos à análise metabolómica do grupo controlo de forma a determinar os metabolitos chave para o nosso futuro estudo. Obtivemos os picos de intensidade correspondentes ao aspartato, creatina, lactato e lípidos, de que iremos posteriormente verificar a sua variação.

Conclusões

Com o presente estudo experimental, observámos que o hipertiroidismo influencia os músculos mastigadores, muito embora não nos seja possível inferir sobre a causa e significado real observados.

São necessários mais estudos nesta área, uma vez que todos os estudos por nós encontrados têm como objectivo o estudo de outros sistemas humanos, como sejam o sistema cardiovascular e renal, o crescimento e o metabolismo, a maturação cerebral e a função gastrointestinal.

Podemos também concluir que o modelo experimental para indução de hipertiroidismo por gavagem com administração da levotiroxina na dose de 250 mg/kg de peso corporal é válido e conduz ao hipertiroidismo (avaliado através do peso diário).

O estudo metabolómico do grupo teste do músculo temporal possibilitar-nos-á a obtenção de respostas mais concretas acerca da influência do hipertiroidismo nos músculos mastigadores.

Resumo

O sistema endócrino é responsável pela regulação e coordenação das actividades celulares em todo o corpo, para além de também ser responsável pelo seu crescimento e desenvolvimento.

As hormonas da tiróide participam em vários sistemas do organismo, sendo um deles o muscular.

No estudo foram utilizados 16 ratos da estirpe Wistar, com cerca de 8 semanas de idade, divididos por dois grupos de forma aleatória (grupo controlo e grupo teste). Todos os animais foram mantidos nas condições padrão do biotério e foi fornecida água e ração *ad libitum*. Os animais do grupo teste foram submetidos à administração de levotiroxina três vezes por semana na dose de 250mg/kg de peso corporal, por gavagem, durante 2 semanas, no fim das quais ambos os grupos foram sacrificados. Foram colhidos fragmentos de músculos masseter e temporal para fixação com etanol a 70% e em solução de formaldeído tamponado a 10%. Em todos os animais foram colhidos dois fragmentos dos músculos masseter e temporal para congelação rápida em azoto líquido e posterior conservação a -70°C. Todos os fragmentos colhidos para histopatologia de rotina foram incluídos em parafina e cortados para lâminas, e posteriormente colorados com Hematoxilina e Eosina. Efectuou-se análise morfométrica e metabolómica dos fragmentos dos músculos. Na análise morfométrica mediu-se a área de secção das fibras musculares em corte transversal e definiu-se para ambos os grupos (controlo e teste), cinco tipos de fibras musculares, de acordo com as secções observadas: fibras muito pequenas, fibras pequenas, fibras médias, fibras grandes e fibras muito grandes. Na análise metabolómica, os fragmentos de tecido muscular do grupo controlo (temporal) foi submetido a espectroscopia de alta resolução com sonda ^1H (*high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy* – HRMAS), e nos espectros obtidos foi analisado a variação de cada um dos metabolitos em análise e feita colheita de dados sobre o comportamento geral dos espectros nas diversas amostras do grupo muscular estudado em todos os indivíduos.

Nos resultados verifica-se que a análise morfométrica do músculo masseter indica-nos um ligeiro aumento da área das fibras musculares, sem significado estatístico. O músculo temporal, por sua vez, apresenta aumento da área ocupada pelas fibras, sendo estatisticamente significativos. A nível metabolómico determinamos os metabolitos chave, presentes no grupo controlo do temporal para futuro estudo.

Em conclusão, podemos afirmar que o hipertireoidismo pode provocar alterações a nível dos músculos mastigadores, nomeadamente do temporal, sendo necessários mais estudos nesta área.

Summary

Endocrine system is responsible for cellular activity regulation and coordination in the human body, being also responsible for the human growth and development.

Thyroid hormones act in various human systems, being one of those the muscular system.

On the current study, 16 male Wistar rats, with 8 weeks of age, were divided in two groups randomly (control and test group). All animals were kept in standard bioterium conditions, with *ad libitum* water and ration. Animals in the test group were doused with 250mg/kg levothyroxine by gavage, during two weeks on the end of which they were sacrificed. Fragments of masseter and temporal muscles were collected and fixed in 70% ethanol and in 10% buffered formaldehyde. In all animals, two fragments of masseter and temporal muscles were collected for quick-freezing and conservation in -70°C liquid nitrogen. All fragments collected for routine histopathology were included in liquid paraffin and cut in a microtome, being then colorized in HE standard protocol. Morphometric and metabolomic analysis to the masticator muscles was then performed. In the morphometric analysis, muscular fibers were analyzed in transversal cuts, measuring their section area. Five muscle fiber groups – very small, small, medium, large and very large - were then defined and both groups were then categorized. In the metabolomic analysis, fragments collected from temporal muscle control group were submitted to high-resolution ^1H probe HRMAS, analyzing each of the metabolites obtained through the control spectra.

The results obtained from morphometric analysis revealed a slight increase in muscle fiber area from masseter muscles, with little significance. Temporal muscle, on the other hand, revealed a significant increase in muscle fiber area. In the metabolomic analysis we determined the key metabolites derived from control temporal muscles, for future studies.

In conclusion, we are able to say that hyperthyroidism can induce alterations in masticator muscles, especially in the temporal muscle, being however necessary further studies.

Bibliografia

1. Kasper *et al* (2004); *Harrison's Principles of Internal Medicine - 16th Edition*; McGraw-Hill Professional
2. Cooper (2003); *Hyperthyroidism*; *The Lancet*; Vol. 362; 459-468
3. Topliss *et al* (2004); *Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Hypothyroidism*; *MJA*; Vol. 180; 186-193
4. Little (2006); *Thyroid Disorders. Part I: Hyperthyroidism*; *Oral Surg Oral Med oral Pathol Oral Radiol Endod*; Vol. 101 (3); 276-284
5. Guyton *et al* (1998); *Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças - Sexta Edição*; 541-548
6. Lange *et al* (2008); *Rapid Activation by 3,5,3 - L- Triiodothyronine of Adenosine 5' - Monophosphate - Activated Protein Kinase/Acetyl-Coenzyme A Carboxylase and Akt/Protein Kinase B Signaling Pathways: Relation to Changes in Fuel Metabolism and Myosin Heavy-Chain Protein Content in Rat Gastrocnemius Muscle "in vivo"*; *Endocrinology*; Vol. 149 (12); 6462-6470
7. Lombardi *et al* (2007); *Acute Administration of 3,5 - Diiodo - L - Thyronine to Hypothyroid Rats Affects Bioenergetic Parameters in Rat Skeletal Muscle Mitochondria*; *FEBS Letters*; Vol. 581; 5911-5916
8. Irrcher *et al* (2008); *Thyroid Hormone (T3) Rapidly Activates p38 and AMPK in Skeletal Muscle "in vivo"*; *J Appl Physiol*; Vol. 104; 178-185
9. Visser *et al* (2009); *Physiological Thyroid Hormone Levels Regulate Numerous Skeletal Muscle Transcripts*; *Endocrinol Metab*; Vol. 94; 3487-3496
10. Fauci *et al* (2008); *Harrison's Principles of Internal Medicine - 17th Edition*; McGraw Hill
11. Casas *et al* (2008); *Overexpression of the Mitochondrial T3 Receptor p43 Induces a Shift in Skeletal Muscle Fiber Types*; *Plos ONE*; Vol. 3 (6); 1-10
12. Zhong *et al* (2009); *Effects of Hypothyroidism on Myosin Heavy Chain Composition and Fibre Types of Fast Skeletal Muscles in a Small Marsupial, Antechinus Flavipes*; *J Comp Physiol B*
13. Phielix *et al* (2008); *Type 2 Diabetes Mellitus and Skeletal Muscle Metabolic Function*; *Physiology & Behavior*; Vol. 94; 252-258
14. Arkkila *et al* (2003); *Musculoskeletal Disorders in Diabetes Mellitus: An Update*; *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*; Vol.17 (6); 945-970
15. Yang *et al* (2009); *Gene Expression Profile of Human Skeletal Muscle and Adipose Tissue of Chinese Han Patients with Type 2 Diabetes Mellitus*; *Biomedical and Environmental Sciences*; Vol. 22; 359-368

16. Lan *et al* (2003); *Gene Expression Profiles of Nondiabetic and Diabetic Obese Mice Suggest a Role of Hepatic Lipogenic Capacity in Diabetes Susceptibility*; *Diabetes*; Vol. 52; 688-700
17. Morvan *et al* (2007); *Metabolomics by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of the Response to Chloroethylnitrosourea Reveals Drug Efficacy and Tumour Adaptive Metabolic Pathways*; *Cancer Res* ; Vol. 67 (5); 2150-2159
18. Dunn *et al* (2005); *Metabolomics: Current Analytical Platforms and Methodologies*; *Trends in Analytical Chemistry*; Vol. 24 (4); 285-294
19. Moco *et al* (2007); *Metabolomics Technologies and Metabolite Identification*; *Trends in Analytical Chemistry*; Vol. 26 (9); 855-866
20. Tiziani *et al* (2009); *Early Stage Diagnosis of Oral Cancer Using ¹H NMR-Based Metabolomics*; *Neoplasia*; Vol. 11; 269-276
21. Van *et al* (2009); *How Close is the Bench to the Bedside? Metabolic Profiling in Cancer Research*; *Genome Medicine*; Vol. 1 (5); 5.1-5.6
22. Robertson (2005); *Metabonomics in Toxicology: a Review*; *Toxicological Sciences*; Vol. 85; 809-822
23. Oresic (2009); *Metabolomics, a Novel Tool for Studies of Nutrition, Metabolism and Lipid Dysfunction*; *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*; Vol. 19; 816-824
24. Wishart (2008); *Quantitative Metabolomics Using NMR*; *Trends in Analytical Chemistry*; Vol. 27 (3); 228-237
25. Weckwerth *et al* (2005); *Metabolomics: From Pattern Recognition to Biological Interpretation*; *DDT*; Vol. 10 (22); 1551-1558
26. Tohge *et al* (2009); *Web-based Resources for Mass-Spectrometry-Based Metabolomics: a User's Guide*; *Phytochemistry*; Vol. 70; 450-456
27. Madsen *et al* (2010); *Chemometrics in Metabolomics – a Review in Human Disease Diagnosis*; *Analytica Chimica Acta*; Vol. 659; 23-33
28. Idle *et al* (2007); *Metabolomics*; *Cell Metab*; Vol. 6 (5); 348-351
29. Issaq *et al* (2009); *Analytical and Statistical Approaches to Metabolomics Research*; *J Sep Sci*; Vol. 32; 2183-2199
30. Powers (2009); *NMR Metabolomics and Drug Discovery*; *Magn Reson Chem*; Vol. 47; S2-S11
31. Reo (2002); *NMR-Based Metabolomics*; *Drug and Chemical Toxicology*; Vol. 25 (4); 375-382
32. Wishart *et al* (2007); *HMDB: the Human Metabolome Database*; *Nucleic Acids Research*; Vol. 35; D521-D526
33. Spratlin *et al* (2009); *Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: a Review*; *Clin Cancer Res*; Vol. 15 (2); 431-440

34. Junqueira *et al* (2004); *Histologia Básica – 10ª Edição*; Guanabara Koogan; 185-205
35. Stevens *et al* (1996); *Human Histology – Second Edition*; Barnes & Noble; 65-70
36. Garant (2003); *Oral Cells and Tissues*; Quintessence Books; 299-320
37. Sundsten *et al* (2009); *Proteomics in Diabetes Research*; Molecular and Cellular Endocrinology; Vol. 297; 93-103
38. Cho (2007); *Proteomics Technologies and Challenges*; *Geno Prot Bioinfo*; Vol. 5 (2); 77-85
39. Chuthapisith *et al* (2007); *Principles of Proteomics and its Applications in Cancer*; Surgeon; Vol. 5 (1); 14-22
40. Bachi *et al* (2008); *Quantitative Proteomics as a New Piece of the Systems Biology Puzzle*; *Journal of Proteomics*; Vol. 71; 357-367
41. Anderson *et al* (2000); *Proteomics: Applications in Basic and Applied Biology*; *Current Opinion in Biotechnology*; Vol. 11; 408-412
42. Silberring *et al* (2010); *Biomarker Discovery and Clinical Proteomics*; *Trends in Analytical Chemistry*; Vol. 29 (2); 128-140
43. Lamartine (2006); *The Benefits of DNA Microarrays in Fundamental and Applied Bio-medicine; Materials Science and Engineering*; Vol. 26; 354-359
44. Francois *et al* (2003); *DNA Microarrays for Detecting Endocrine-disrupting Compounds*; *Biotechnology Advances*; Vol. 22; 17-26
45. Meloni *et al* (2004); *DNA Microarrays and Pharmacogenomics*; *Pharmacological Research*; Vol. 49; 303-308
46. Krenn *et al* (2004); *Array Technology and Proteomics in Autoimmune Diseases*; *Pathology – Research and Practice*, Vol. 200; 95-103
47. Park *et al* (2006); *Fluorescence-based Assay Formats and Signal Amplification Strategies for DNA Microarray Analysis*; *Chemical Engineering Science*; Vol. 61; 954-965
48. Hal *et al* (2000); *The Application of DNA Microarrays in gene Expression Analysis*; *Journal of Biotechnology*; Vol. 78; 271-280
49. Hanai *et al* (2006); *Application of Bioinformatics for DNA Microarray Data to Bioscience, Bioengineering and Medical Fields*; *Journal of Bioscience and Bioengineering*; Vol. 101 (5); 377-384
50. Alberts *et al* (2007); *Fundamentos de Biologia Celular – 2ª Edição*; Artmed
51. Rhodius *et al* (2009); *Technical Considerations in Using DNA Microarrays to Define Regulons*; *Methods*; Vol. 47; 63-72
52. Ye *et al* (2001); *Applications of DNA Microarrays in Microbial Systems*; *Journal of Microbiological Methods*; Vol. 47; 257-272

53. Haslett *et al* (2002); *Microarray Analysis of Normal and Dystrophic Skeletal Muscle*; *Int J Devl Neuroscience*; Vol. 20; 359-365
54. Bendixen *et al* (2005); *Functional Genomics in Farm Animals – Microarray Analysis*; *Meat Science*; Vol. 71; 128-137
55. Hughes *et al* (2001); *DNA Microarrays for expression Profiling*; *Current Opinion in Chemical Biology*; Vol. 5; 21-25
56. Jaumot *et al* (2006); *Exploratory Data Analysis of DNA Microarrays by Multivariate Curve Resolution*; *Analytical Biochemistry*; Vol. 358; 76-89
57. Hayashi (2004); *Prediction of Hormone Sensitivity by DNA Microarray*; *Biomedicine & Pharmacotherapy*; Vol. 58; 1-9
58. Stenger *et al* (2002); *Potential Applications of DNA Microarrays in Biodefense-related Diagnostics*; *Current Opinion in Biotechnology*; Vol. 13; 208-212
59. Epstein *et al* (2000); *Microarray Technology – Enhanced Versatility, Persistent Challenge*; *Current Opinion in Biotechnology*; Vol.11; 36-41
60. Parsons *et al* (2009); *How to Make Tissue Microarrays*; *Diagnostic Histopathology*; Vol. 15 (3); 142-150
61. Kuo *et al* (2002); *Gene Expression Profiling by DNA Microarrays and its Application to Dental Research*; *Oral Oncology*; Vol. 38; 650-656
62. Bowden *et al* (2004); *DNA Microarray Technology: Insights for Oral and Maxillofacial Surgeons*; *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; Vol. 42; 542-545
63. Wang *et al* (2005); *A Method for Fabricating Uni-dsDNA Microarray Chip for Analysing DNA-binding Proteins*; *J Biochem Biophys Methods*; Vol. 63; 100-110
64. Folpe (1999); *Practical Applications of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Soft Tissue Neoplasms*; *Surgical Oncology*; Vol. 8; 197-203
65. Moreau *et al* (1998); *Approach to Automation in Immunohistochemistry*; *Clinica Chimica Acta*; Vol. 278; 177-184
66. Warford *et al* (2004); *Expression Profiling by High-throughput Immunohistochemistry*; *Journal of Immunological Methods*; Vol. 290; 81-92
67. Warford *et al* (2007); *Assessing the Potential of Immunohistochemistry for Systematic Gene Expression Profiling*; *Journal of Immunological Methods*; Vol. 318; 125-137
68. D'Amico *et al* (2009); *State of the Art in Antigen Retrieval for Immunohistochemistry*; *Journal of Immunological Methods*; Vol. 341; 1-18
69. Lombardi *et al* (2009); *Defining the Transcriptomic and Proteomic Profiles of Rat Ageing Skeletal Muscle by the Use of a cDNA Array, 2D- and Blue Native-Page Approach*; *Journal of Proteomics*; Vol. 72; 708-721

70. Naaby-Hansen *et al* (2001); *Proteomics – Post-genomic Cartography to Understand Gene Function*; TRENDS in Pharmacological Sciences; Vol. 22 (7); 376-384
71. Santos; *Princípios Básicos de Imunocitoquímica*; Departamento de Zoologia FCTUC
72. Kuncová *et al* (2000); *Vasoactive Intestinal Polypeptide in Rat Heart Atria: The Effect of Hyperthyroidism*; *Physiol Res*; Vol. 49; 427-434
73. Boehm *et al* (2001); *Increased Uncoupling Proteins and Decreased Efficiency in Palmitate-perfused Hyperthyroid Rat Heart*; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; Vol. 280; 977-983
74. Broedel *et al* (2003); *Effects of Hyper- and Hypothyroidism on Thyroid Hormone Concentrations in Regions of the Rat Brain*; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; Vol. 285; 470-480
75. Bussemaker *et al* (2003); *Hyperthyroidism Enhances Endothelium-dependent Relaxation in the Rat Renal Artery*; *Cardiovascular Research*; Vol. 59; 181-188
76. Iwata *et al* (2004); *Acute Hyperthyroidism Alters Adrenoceptor- and Muscarinic Receptor-mediated Responses in Isolated Rat Renal and Femoral Arteries*; *European Journal of Pharmacology*; Vol. 493; 191-199
77. Honda *et al* (2000); *Changes in Vascular Reactivity Induced by Acute Hyperthyroidism in Isolated Rat Aortae*; *General Pharmacology*; Vol. 34; 429-434
78. Rodríguez-Gómez *et al* (2005); *Effects of Chronic Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase in Hyperthyroid Rats*; *Am J Physiol Endocrinol Metab*; Vol. 288; 1252-1257
79. Moreno *et al* (2005); *Cardiac and Renal Antioxidant Enzymes and Effects of Tempol in Hyperthyroid Rats*; *Am J Physiol Endocrinol Metab*; Vol. 289; 776-783
80. Bruno *et al* (2005); *Hypo- and Hyperthyroidism Affect the ATP, ADP and AMP Hydrolysis in Rat Hippocampal and Cortical Slices*; *Neuroscience Research*; Vol. 52; 61-68
81. Venditti *et al* (2005); *Effect of Prolonged Exercise on Oxidative Damage and Susceptibility to Oxidants of Rat Tissues in Severe Hyperthyroidism*; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; Vol. 442; 229-237
82. Mogulkoc *et al* (2006); *Melatonin Prevents Oxidant Damage in Various Tissues of Rats With Hyperthyroidism*; *Life Sciences*; Vol. 79; 311-315
83. Kumar *et al* (2007); *Hyperthyroidism Induces Apoptosis in Rat Liver Through Activation of Death Receptor-mediated Pathways*; *Journal of Hepatology*; Vol. 46; 888-898
84. Halapas *et al* (2007); *Experimental Hyperthyroidism Increases Expression of Parathyroid Hormone-related Peptide and Type-1 Parathyroid Hormone Receptor*

in Rat Ventricular Myocardium of the Langendorff Ischaemia-reperfusion Model;
Exp Physiol; Vol. 93 (2); 237-246

85. Branvold *et al* (2008); *Thyroid Hormone Effects on LKB1, MO25, Phospho-AMPK, Phospho-CREB, and PGC-1 α in Rat Muscle;* J Appl Physiol; Vol. 105; 1218-1227

86. Mitasíková *et al* (2009); *Diabetes and Thyroid Hormones Affect Connexin-43 and PKC- ϵ Expression in Rat Heart Atria;* Physiol Res; Vol. 58; 211-217

Índice

Introdução	1
Aspectos Morfofuncionais dos Músculos Mastigadores	2
<i>Tecido Muscular</i>	2
<i>Histofisiologia do Músculo Esquelético</i>	2
<i>Organização do Músculo Esquelético</i>	3
Avaliação Molecular de Músculos Mastigadores	6
<i>Metabolómica</i>	6
<i>Genómica</i>	8
<i>Proteómica</i>	9
<i>Imunohistoquímica</i>	11
Patologia Endócrina e Modelos Experimentais	13
<i>Hipertiroidismo</i>	13
<i>Diabetes Mellitus</i>	15
<i>Modelos Experimentais para o estudo do Hipertiroidismo</i>	19
Contribuição Pessoal	21
<i>Nota Introdutória e Objectivos do Estudo</i>	21
<i>Material e Métodos</i>	21
<i>Resultados</i>	24
<i>Discussão</i>	31
<i>Conclusões</i>	33
Resumo/Summary	34
Bibliografia	36
Diana Filipa Rebelo	42