

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TESE

**AVALIAÇÃO DO *STATUS* FUNCIONAL DA GLÂNDULA TIREOIDE
COMPARADO COM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS, HISTOLÓGICOS E MOLECULARES NA PELE DE
CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER**

Renata Ribeiro Novais de Carvalho

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DO *STATUS* FUNCIONAL DA GLÂNDULA TIREOIDE
COMPARADO COM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS, HISTOLÓGICOS E MOLECULARES NA PELE DE
CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER**

RENATA RIBEIRO NOVAIS DE CARVALHO

Sob a Orientação do Professor
Luis Carlos Reis

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas

Seropédica, RJ
Outubro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C331 a Carvalho, Renata Ribeiro Novais de, 1983-
AVALIAÇÃO DO STATUS FUNCIONAL DA GLÂNDULA TIREÓIDE
COMPARADO COM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS,
HISTOLÓGICOS E MOLECULARES NA PELE DE CÃES DA RAÇA
GOLDEN RETRIEVER / Renata Ribeiro Novais de Carvalho.
- 2017.
92 f.

Orientador: Luis Carlos Reis. Tese(Doutorado).
- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, 2017.

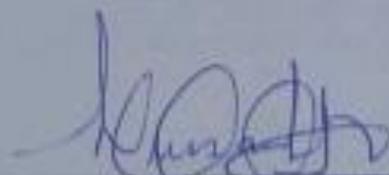
1. Hipotireoidismo. 2. Cães. 3. Endocrinologia. 4.
Testes hormonais. 5. PCR. I. Reis, Luis Carlos, 1952
, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

RENATA RIBEIRO NOVAIS DE CARVALHO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

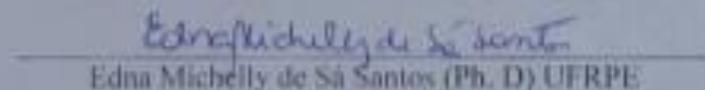
TESE APROVADA EM 04/10/2017



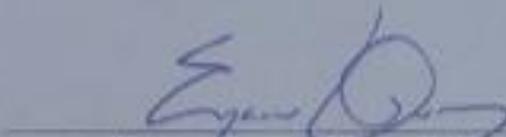
Luis Carlos Reis (Ph. D) UFRRJ
(orientador)



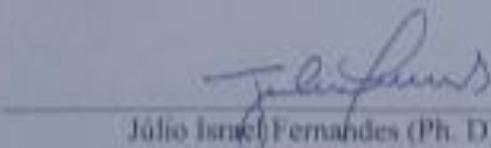
Patricia Cristina Lisboa da Silva (Ph. D) UERJ



Edna Michelly de Sá Santos (Ph. D) UFRPE



Emerson Lopes Olivares (Ph. D) UFRRJ



Júlio Israel Fernandes (Ph. D) UFRRJ

Dedicatória

Dedico este trabalho aos 21 Goldens e à ciência.

Agradecimentos

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ser uma de minhas casas ao longo destes 15 anos. A mais bela e eterna. E a todos em que nela fui apresentada e, de alguma forma, estiveram presentes ainda que indiretamente na essência da minha formação;

Ao meu orientador, professor Dr. Luis Carlos Reis, por todo ensinamento ao longo destes 7 anos de trabalho, pela amizade e pela inspiração;

Ao professor Dr. André Mecawi, outrora meu calouro na faculdade e hoje meu Mestre por toda ajuda e inspiração que se tornou;

A toda equipe de professores, funcionários e alunos do Departamento de Ciências Fisiológicas que sempre estiveram por perto na minha formação, em especial na pós-graduação, dentre os quais eu destaco os mestres Iracema Gomes por todo o apoio no início deste projeto; Emerson Olivares por ser uma de minhas referências no estudo da tireoide; Wellington Cortes, Magda Medeiros e Frederico Argolo Vanderlinde por serem sempre solícitos e amistosos; ao Roberto Laureano, meu eterno calouro, do qual levo nossa amizade como prêmio destes últimos 7 anos;

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária que sempre atendeu às minhas solicitações, em especial à Lorena por toda receptividade e ajuda;

Ao prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo que esteve presente na banca de seleção do doutorado e, mesmo sem saber, contribuiu para que minha motivação fosse ainda maior neste trabalho;

Ao querido Raphael Scherer pela ideia e incentivo para que eu trabalhasse com Goldens;

Ao professor José Jorge de Carvalho e colaboradores que, com toda paciência, abriram as portas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro;

Aos meus alunos que participaram ativamente no projeto ou, ainda, aqueles que participaram de forma indireta com incentivos e compreensão por certa ausência. Destes, agradeço em especial à Larissa Ferreira, Luís Augusto Sampaio, Endiara Rodrigues e Daniela Sampaio;

Às colegas de profissão Rafaela Pisani, Fernanda Paiani, Fernanda Maurício, Paulo Diniz, Mariana Correa, Lio Moreira e equipe, por toda ajuda e apoio, bem como ao Rafael Maurício e Ivani Diniz.

Ao setor de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFRRJ e direção não só por permitir o uso de suas dependências para a elaboração deste trabalho, mas também por serem eternos amigos. Aproveito para agradecer a toda equipe do setor de Dermatologia liderado pelo prof. Dr. Júlio Fernandes pelo apoio e liberação do espaço físico, bem como pela amizade;

À prof. Dra. Regina Ramadilha pela inspiração e porque sinto que faz parte deste trabalho indiretamente;

Ao prof. Vitor Castillo pela inspiração;

Ao Centro de Ensino Superior de Valença por entender, apoiar e incentivar cada passo desta pesquisa, em especial à Prof. Valesca Oliveira pela liberação do espaço físico da Policlínica Veterinária Escola para execução do projeto, bem como todos aqueles que lá trabalham e sempre estiveram por perto apoiando e ajudando;

Ao amigo e prof. Dr. Fabrício Gaudêncio pelo apoio e execução das análises bioquímicas, bem como ao prof. Dr. Jairo Pinheiro que permitiu o acesso ao laboratório;

À prof. Dra. Isis Hara Tevenzoli e sua pós-doutoranda Dra. Flavia do laboratório de Endocrinologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ pela ajuda com a homogeneização do material coletado para PCR;

Aos amigos que entenderam várias situações em que tive que estar ausente para me dedicar a este trabalho. Muito obrigada, em ordem alfabética a: Alan, Cris, Dani, Davi, Di, Edna, Igor, Josué, Luana, Luciana, Marco, Paty, Tati e Thaís. Amo vocês!

Obrigada também a cada um que se envolveu na busca pelos Golden nas redes sociais e na vida real;

Obrigada aos tutores de cada Golden que colaboraram incansavelmente com este estudo. Muito obrigada pela colaboração, compreensão e apoio;

Aos queridos Apolo, Apollo, Bell, Bono, Byron, Dodge, Johnny, Jordão, Kevin, Lion, Logan, Lucky, Maddox, Marley, Max, Petros, Raji, Shitan, Thor, Thor e Zeus.

Às autoras-inspirações Sylvie Daminet e Sheila Torres pelas prontas respostas de e-mail de grande valia e ajuda no trabalho;

Às agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq;

Aos responsáveis por tudo isto, meus pais, Francisco e Regina por serem quem são. Por tudo. Sempre. Ao meu irmão Rodrigo e minha cunhada Adriana pela descontração de sempre. Amo vocês!

Aos meus amores Scott, Totti, Raul, Manuel, Maria Clara, Lucas, Daniel e Manuela por representarem a alegria e amor em nossas vidas;

Ao meu amor, Rodrigo Mencialha, por ser esse parceiro incrível! Obrigada por toda paciência neste momento importante de minha carreira. Agradeço também por abrir as portas da docência para mim no meio deste trabalho. Obrigada pelo apoio incondicional e por tornar meus dias os melhores sempre. Eu te amo!

RESUMO

CARVALHO, Renata Ribeiro Novais de. **Avaliação do Status Funcional da Glândula Tireoide Comparado com Parâmetros Hematológicos, Bioquímicos, Histológicos e Moleculares na Pele de Cães da Raça Golden Retriever.** 2017. 92f. Tese (Doutorado Em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017).

O hipotireoidismo é uma doença hiperdiagnosticada em cães devido ao desafio que representa para o médico veterinário. Além de não apresentar sinais clínicos específicos, os métodos diagnósticos disponíveis na rotina clínica são falhos. Além desta problemática, novos estudos vêm surgindo evidenciando que os valores de referência usuais por espécie são ultrapassados e não correspondem à realidade diagnóstica. Com objetivo de avaliar os recursos laboratoriais em conjunto para diagnóstico desta endocrinopatia, foram utilizados 21 cães machos da raça Golden Retriever, variando entre 4 e 12 anos de idade. Todos os animais eram suspeitos de hipotireoidismo por pelo menos um sinal clínico ou laboratorial compatível, segundo a literatura. Além disso, todos foram avaliados quanto à ingestão diária de iodo devido à possibilidade dos resultados hormonais serem compatíveis com o efeito Wolff-Chaikoff. Na primeira fase do estudo, foram mensurados T4 livre por diálise (T4ld) e o hormônio estimulador da tireoide (TSH). Utilizando os valores normais para a espécie como referência, foi possível distribuir os animais em dois grupos devido à diferença estatística de T4ld ($p=0,023$): (1) Eutireoideos ($n=13$) e (2) Hipotireoideos ($n=8$). É importante destacar que não houve diferença significativa entre os grupos com relação à concentração plasmática de TSH ($p=0,0455$). Clinicamente, não houve relação entre os sinais apresentados com os resultados hormonais. Acerca da ingestão de iodo, foi possível perceber que todos os animais estavam sendo submetidos a dietas com excesso do microelemento, embora estas concentrações não possam ser relacionadas com a variação hormonal. A partir de então, iniciou-se a segunda fase do estudo com 12 cães submetidos ao teste de estimulação com TSH recombinante humano (rhTSH) e biópsia de pele para histopatologia e PCR em tempo real. Este último para determinar a expressão da desidase do tipo 2 (D2) e receptor de hormônio tireoideano do tipo β ($Tr\beta$). O teste de estimulação com rhTSH revelou diferença significativa entre a concentração de T4t pré e pós-TSH em ambos os grupos (grupo 1: $p<0,05$; grupo 2: $p<0,001$). Todavia, não houve diferença estatística entre os grupos. Os resultados obtidos a partir do exame histopatológico foram inconsistentes tanto para suscitar a doença como para excluí-la, sugerindo ser um exame auxiliar falho. Não obstante, ao avaliar os resultados hormonais frente a referência racial, nota-se que, na realidade, pode-se estar diante de 21 cães normotireoideos e, portanto, os resultados estatisticamente insignificantes seriam esperados. Desta forma, é possível concluir que os valores de referência necessitam ser utilizados com cautela e quanto menos variáveis existir neste quesito, maior a acurácia do diagnóstico.

Palavras-chave: Hipotireoidismo, Desiodase, PCR

ABSTRACT

CARVALHO, Renata Ribeiro Novais de. **Thyroid Gland Functional Status Evaluation compared with Hematological, Biochemical, Histological and Molecular Parameters in the Skin of Golden Retriever Dogs** 2017. 92p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Veterinary Institute. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017).

Canine hypothyroidism is overdiagnosed because it is a real challenge for clinicians. In addition to not presenting specific clinical signs, the diagnostic methods available in the clinical routine are flawed. Besides that, new studies have emerged evidencing that the usual reference values by species are exceeded and do not correspond to the real diagnostic. In order to evaluate the laboratory tests used to diagnose this endocrinopathy, 21 male Golden Retriever dogs, ranging from 4 to 12 years of age, were used. All animals showed some clinical signs suggesting hypothyroidism or laboratory-compatible signal, according to the literature. Furthermore, all dogs were evaluated for the daily intake of iodine due to the possibility that the hormonal results are compatible with the Wolff-Chaikoff effect. In the first phase of the study, free T4 (fT4) and thyroid stimulating hormone (TSH) were measured. Using the normal values for the species as reference, it was possible to distribute animals in two groups due to the statistical difference of T4ld ($p = 0.023$): (1) Euthyroid ($n = 13$) and (2) Hypothyroid ($n = 8$). It is important to note that there was no significant difference between the groups regarding the plasma TSH concentration ($p = 0.0455$). Clinically, there was no relationship between the signs presented with the hormonal results. Regarding iodine intake, it was possible to observe that all the animals were being submitted to diets with excess microelement, although these concentrations could not be related to the hormonal variation. Thereafter, the second phase of the study was started with 12 dogs submitted to the stimulation test with human recombinant TSH (rhTSH) and skin biopsy for histopathology and real-time PCR. This was used to determine the expression of type 2 deiodinase (D2) and type β thyroid hormone receptor (Tr β). The rhTSH stimulation test revealed a significant difference between total T4 concentrations before and after TSH in both groups (group 1: $p < 0.05$, group 2: $p < 0.001$). However, there was no statistical difference between those groups. Histopathological examination were inconsistent both to elicit the disease and to exclude it, suggesting that it is a faulty auxiliary examination. Nevertheless, when evaluating the hormonal results against the racial reference, it can be observed that in fact, there were 21 normotireoideos dogs and, therefore, the statistically insignificant results would be expected. In this way, it is possible to conclude that reference values should be used with caution and it is necessary to decrease the variables to improve the accuracy of the diagnosis.

Keywords: Hypothyroidism, Deiodinase, PCR

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Topografia da glândula tireoide em cão - Fonte: VALA, et al. 2013.

Figura 2. Folículos tireoidianos. Barra = 25 μ m. Fonte: VALA et al., 2013.

Figura 3. Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Fonte: GOODMAN; GILMAN, 2006.

Figura 4: Visualização simplificada da síntese de HT, relação com eixo HHT e atuação em tecidos-alvo. Fonte: MEDICI et al., 2014.

Figura 5. Esquema representativo da ativação de células-alvo pela ação genômica de HT. T3 e T4 são transportados para o meio interno celular. No citoplasma, T4 sofre desiodação, dando origem a T3. T3 atinge o núcleo e interage com o receptor de HT que está formando um heterodímero com o receptor de retinoide X no TRE. Esta ligação medeia a transcrição gênica que leva à formação de proteínas para variadas funções. São demonstradas ações de HT em diferentes sistemas. Fonte: GUYTON; HALL, 2006.

Figura 6. Esquema representativo da ação não-genômica do hormônio tireoidiano. A ligação de T4 e T3 com a proteína de membrana integrina α V β 3 ativa a sinalização MAPK (ERK1/ERK2), que ativará uma série de proteínas (TRIB, ERa, STAT1a) pela fosforilação de serinas que atuarão na mobilização das proteínas de tráfego, contribuindo indiretamente para a ação genômica do hormônio tireoidiano. Fonte: AIRES, 2008.

Figura 7. Estrutura química e inter-relação entre as principais iodotironinas ativadas ou inativadas pelas desidases. Fonte: BIANCO et al., 2002.

Figura 8. (a) Folículo em telógeno contendo um eixo do pelo (seta grossa). Observe a posição da papila dérmica (seta 1); (b) Vários folículos kenogênicos (flechas grossas). HE. Barra = 100 μ m. Fonte: MÜNTENER et al., 2012.

Figura 9. Moderada vacuolização (vacúolos preenchidos por substância eosinofílica) de músculo piloerector da pele da região cervical. HE, Obj. 25X. Fonte: GONZÁLEZ et al., 2016.

Figura 10. Idade média dos animais em anos de acordo com cada grupo definido. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

Figura 10. Escore de condição corporal. A primeira coluna representa os dados correspondentes ao grupo eutireoideo; e a segunda coluna refere-se aos cães diagnosticados com hipotireoidismo. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

Figura 11. Nível médio de T4 livre X concentração de iodo na dieta. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

Figura 12: Gráfico da mensuração de TSH em ng/mL. Na primeira barra são representados os valores de TSH do grupo eutireoideo; na segunda barra, os valores do mesmo hormônio do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

Figura 13: Gráfico da mensuração de T4 livre por diálise (T4ld) em ng/dL. Na primeira barra são representados os valores de T4ld do grupo eutireoideo; na segunda barra, os valores do mesmo hormônio do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p<0,01).

Figura 14: Gráfico da mensuração de T4 total basal. Na primeira coluna são representados os valores de T4t do grupo eutireoideo; na segunda coluna, os valores do mesmo hormônio do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

Figura 15: Gráfico da mensuração de T4 total após estimulação com rhTSH. Na primeira coluna são representados os valores de T4t do grupo eutireoideo; na segunda coluna, os valores do mesmo hormônio do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

Figura 16: Gráfico representando o teste de estimulação com rhTSH realizado no grupo eutireoideo. Na primeira coluna é representada a média dos valores de T4t basal; na segunda coluna, a média dos valores após estimulação com TSH. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p<0,05).

Figura 17. Gráfico representando o teste de estimulação com rhTSH realizado no grupo hipotireoideo. Na primeira coluna é representada a média dos valores de T4t basal; na segunda coluna, a média dos valores após estimulação com TSH. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p<0,001).

Figura 18. Expressão de mRNA GAPDH. Gráfico exibindo a ausência de diferença significativa entre os grupos. Na primeira coluna é representada a média dos valores de GAPDH do grupo eutireoideo; na segunda coluna, a média dos valores de GAPDH do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

Figura 19. Expressão de mRNA Desiodase tipo 2. Gráfico exibindo a ausência de diferença significativa entre os grupos. Na primeira coluna é representada a média dos valores de D2 do grupo eutireoideo; na segunda coluna, a média dos valores de D2 do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

Figura 20. Expressão de mRNA Tr β . Gráfico exibindo a ausência de diferença significativa entre os grupos. Na primeira coluna é representada a média dos valores de Tr β do grupo eutireoideo; na segunda coluna, a média dos valores de Tr β do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

Figura 21. Fotomicrografia de epiderme. Verifica-se atrofia superficial. HE, Obj. 10X.

Figura 22. Fotomicrografia. Em derme, glândulas sebáceas sem particularidades, esparsamento das fibras colágenas e moderada vacuolização e hipertrofia de músculo piloerector. HE, Obj. 25X.

Figura 23. Fotomicrografia. Em derme, verifica-se folículo piloso em fase kenógena. HE, 16x.

Figura 24. Fotomicrografia. Em derme, verificam-se folículos pilosos em fase telógena, exibindo queratinização tricolemal – Folículo em “chama”. HE, 25x

ÍNDICE DE TABELAS

Figura 1. Topografia da glândula tireoide em cão - Fonte: VALA, et al. 2013.

Tabela 1: Classificação do hipotireoidismo segundo CASTILLO et al., 2011.

Tabela 2: Idade dos animais incluídos no estudo e número de animais por idade

Tabela 3: Resultados de dosagens de TSH utilizados como critérios de exclusão para a segunda fase do estudo.

Tabela 4: Resultados de dosagens de TSH dos 12 animais selecionados para a segunda fase do estudo.

Tabela 5: Resultado de T4 livre por diálise (T4l/d) obtidos a partir da mensuração nos 12 animais selecionados para a segunda fase do estudo

Tabela 6: Resultado de T4 livre por diálise (T4l/d) obtidos a partir da mensuração nos 9 animais excluídos da segunda fase do estudo

Tabela 7: Dosagem de T4 total basal e após estimulação com TSH

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAFCO	Association of American Feed Control Official
Anti-TPO:	Auto-anticorpos anti-tireoperoxidase
ALT:	Alanino-amino transferase
AST:	Aspartato aminotransferase
BAT:	Tecido adiposo marrom
CEUA:	Comissão de Ética no Uso de Animais
D1 ou Dio1:	Desiodase tipo 1
D2 ou Dio2:	Desiodase tipo 2
D3 ou Dio3:	Desiodase tipo 3
DIT:	Di-iodotirosina
FA:	Fosfatase alcalina
FEDIAF	Fédération Européenne de l'Industrie des Aliments pour animaux Familiers
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenase
GGT:	γ -glutamyl transferase
HDL:	Lipoproteínas de alta densidade
HHT:	Hipotálamo-hipófise-tireoide
HT:	Hormônio(s) Tireoidiano(s)
IR:	Intervalos de referência
LDL:	Lipoproteínas de baixa densidade
LH:	Hormônio luteinizante
MCT:	Monocarboxilato
MIT:	Monoiodotirosina
NR:	Receptores nucleares
OATP:	Transportadores de ânions orgânicos
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN:	Paraventricular (Núcleo)
qRT-PCR:	Reação de Cadeia de Polimerase em Tempo Real
RGD:	Peptídeo arginina-glicina-asparagina
rhTSH:	TSH recombinante humano
RXR:	Receptor de retinoide X ou ácido retinoico
T3:	Tri-iodotironina
T3r:	Tri-iodotironina reversa
T3t:	Tri-iodotironina total
T4:	Tiroxina ou Tetraiodotironina
T4t:	Tiroxina total
TBG:	Proteína ligadora de tiroxina
TBP _a :	Pré-albumina ligadora de tiroxina
TETRAC:	Ácido tetraiodoacético
TgAA:	Auto-anticorpos anti-tireoglobulina
TPO:	Tireoperoxidase
Tr:	Receptor de hormônios tireoidianos
TRE:	Elementos de resposta aos hormônios tireoidianos
TRH:	Hormônio liberador da tireotrofina
TSH:	Hormônio estimulador da tireoide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 A Glândula Tireoide	15
2.2 Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.....	16
2.3 Hormônios tireoidianos	17
2.3.1 Síntese e Secreção dos Hormônios Tireoidianos.....	18
2.3.2 Mecanismo de Ação dos Hormônios Tireoidianos.....	19
2.3.3 Metabolismo Extratireoidiano	22
2.4 Etiologia	25
2.4.2 Avaliação dos sinais clínicos.....	26
2.4.3 Diagnóstico do Hipotireoidismo.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Apreciação Bioética.....	35
4.2. Local	35
4.3. Animais.....	35
4.4. Grupos Experimentais	35
4.5 Obtenção de amostras sanguíneas	35
4.6 Dosagens hormonais.....	36
4.6.1 T4 livre	36
4.6.2 TSH.....	36
4.6.3 Teste de Estimulação com TSH	36
4.6.4 T4 total.....	36
4.6.5 Análise hematológica e bioquímica.....	36
4.7 Biópsia cutânea.....	37
4.8 Técnica de Reação de Cadeia de Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>) em tempo real (qRT-PCR)	38
4.9 Histopatologia	39
4.10 Avaliação dos sinais clínicos.....	39
4.11 Concentração de Iodo na dieta.....	39
4.12 Análise Estatística	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Aspectos clínicos gerais.....	41
5.1.1 Idade	41
5.1.2 Avaliação dos sinais clínicos.....	42
5.2 Concentração de iodo na dieta.....	43

5.2 Análise hematológica e bioquímica.....	44
5.3 Dosagens hormonais.....	44
5.4 Análise molecular - qRT-PCR.....	49
5.5 Aspectos histopatológicos	51
5.5.1 Epiderme.....	51
5.5.2 Derme	51
6 DISCUSSÃO	54
6.1 Aspectos clínicos	54
6.2 Concentração de Iodo na dieta.....	56
6.3 Análise hematológica e bioquímica.....	57
6.4 Dosagens hormonais.....	58
6.4.1 T4 livre por diálise.....	59
6.4.2 Teste de estimulação com TSH	60
6.4.3 TSH.....	61
6.5 Síndrome do Eutireoideo Doente	63
6.6 Análise molecular – RT-PCR.....	63
6.6.1 Desiodases	64
6.6.1 Receptor de hormônio tireoidiano (Tr β).....	65
6.7 Aspectos histológicos	66
6.8 Considerações Diagnósticas	66
7 CONCLUSÕES	68
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

As endocrinopatias têm sido diagnosticadas de forma cada vez mais rotineira na clínica de animais de companhia. Assim como observado em humanos, de modo geral, a expectativa de vida dos cães é maior quando comparada ao mesmo dado há alguns anos. Atualmente, não é incomum o atendimento de cães com mais de 15 anos de idade e os exames preventivos anuais passaram a incluir testes hormonais. Concomitantemente, a introdução de novos métodos de análises no protocolo clínico, contribuiu para o aumento dos diagnósticos de distúrbios endócrinos. Dentre as doenças glandulares mais comumente diagnosticadas em cães, destaca-se o hipotireoidismo. Esta deficiência na síntese e liberação de hormônios tireoidianos vem sendo apontada como a causa de inúmeros sinais clínicos crônicos provenientes de distúrbios em diversos sistemas. Atribuir ao hipotireoidismo tantos possíveis sinais clínicos inespecíficos é prematuro uma vez que toda a sintomatologia pode estar presente em diversas outras enfermidades crônicas. Não obstante, é bem descrito na literatura que o nível plasmático dos hormônios tireoidianos tende a reduzir em diversas situações e/ou desafios terapêuticos que podem comprometer também o transporte e metabolismo destes hormônios, fazendo com que o paciente atravesse um período em que é chamado de eutireoideo doente, isto é, a glândula tireoide está preservada, embora possa ocorrer a redução dos níveis séricos de seus hormônios. Inadvertidamente, diversos profissionais, na tentativa de promover a melhora do paciente, instituem a reposição hormonal. Consequentemente, a produção endógena de hormônios tireoidianos reduz, podendo cessar, e o hipotireoidismo pode de fato ser estabelecido de forma iatrogênica, embora não se manifeste e clinicamente o animal não apresente sinais ou, de forma mais rara, apresente aqueles relacionados a hipertireoidismo, visto que está sob efeito do hormônio exógeno. Não obstante, a falta de benefício da reposição instituída inadvertidamente aliada à necessidade de adesão por parte do tutor do animal e todos os custos envolvidos destacam que a reposição hormonal deve ser tratamento exclusivo de pacientes hipotireoideos com diagnóstico comprovado. Por estes diversos motivos, o expressivo número de pacientes diagnosticados com hipotireoidismo há anos desperta o interesse científico com o intuito de explicar a fase transitória, muito mais frequente que o hipotireoidismo propriamente dito. É importante destacar que novos estudos estão sendo publicados na tentativa de padronizar os valores hormonais por raça, tornando esta prática uma tendência mundial. Além disso, algumas evidências sugerem que possa existir um fenômeno que poderia ser entendido como um *hipotireoidismo tecidual*, à semelhança do que ocorre na resistência aos hormônios tireoidianos. Por conseguinte, embora a função tireoidiana esteja intacta, outros mecanismos extratireoidianos inerentes à ação dos hormônios tireoidianos estariam deficientes. É evidente a importância das etapas periféricas tanto no controle da liberação dos hormônios tireoidianos por mecanismo de retroalimentação com o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, bem como na sua ação. Diante da importância da conclusão diagnóstica para os casos suspeitos de hipotireoidismo, este trabalho é fundamental para analisar as alterações do metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos que podem auxiliar a justificar a observação de sinais clínicos compatíveis com hipotireoidismo, após a exclusão de outras enfermidades. Outrossim, este estudo translacional é o primeiro a conectar a observação da sintomatologia e patologia clínica com bases moleculares do hipotireoidismo em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Glândula Tireoide

A tireoide é a glândula mais importante na regulação do metabolismo animal. Ela está presente em todos os vertebrados e varia morfológicamente entre eles. A tireoide canina é composta por dois lobos em formato oval e alongado de coloração marrom escura, localizados em cada lado da traqueia. Assim como ocorre em bovinos, os lobos tireóideos dos carnívoros são conectados por um istmo glandular, diferentemente de outras espécies que apresentam istmo fibroso, como ovinos, caprinos e equinos. O lobo direito é ligeiramente cranial em comparação com o esquerdo. Eles estão situados caudalmente à cartilagem cricoide e medialmente às artérias carótidas direita e esquerda na região entre a 5ª e 9ª cartilagem traqueal (figura 1) (COSTA et al., 2013; VALA et al., 2013). A tireoide pode se encontrar ligeiramente caudal ou, por vezes, sobreposta à laringe (DYCE et al., 2009). O peso total da tireoide em cães adultos varia de 40 a 400mg/kg devido às variações de tamanhos entre as raças e ela não é palpável em cães saudáveis (SMITHCORS, 1968). Seu tamanho médio é de $2,0 \times 1,0 \times 0,5\text{cm}^3$ (MCDONALD, 1969), podendo ser maior especialmente em cães braquicefálicos (DYCE, 2009). Microscopicamente, o parênquima é composto por lóbulos e no interior de cada um, encontram-se duas glândulas paratireóides (CUNNINGHAM, 2008).

A irrigação sanguínea da glândula tireoide é realizada pelas artérias tireóideas cranial e caudal. A drenagem é papel das veias tireóideas cranial e caudal e pelo sistema linfático. A inervação provém de fibras nervosas da porção simpática do gânglio cervical da traqueia e do nervo laríngeo cervical (EVANS, 2013).

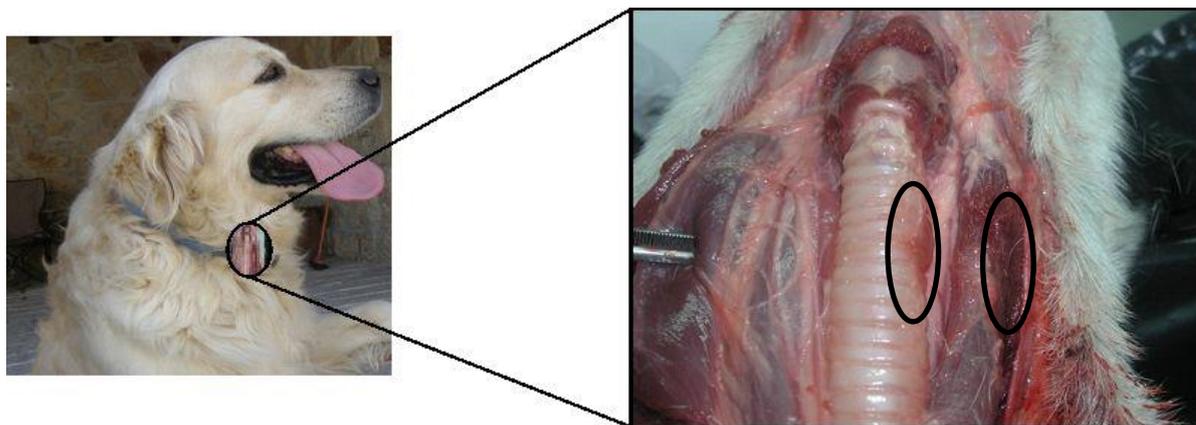


Figura 1. Topografia da glândula tireoide em cão - Fonte: VALA, et al. 2013.

A estrutura básica da tireoide é única entre as glândulas endócrinas. Ela é composta por células epiteliais que variam em formato de cuboide a colunares (tireócitos ou células foliculares), a depender do estímulo de TSH (MCDONALD, 1969). Elas estão dispostas em arranjo circular, formando os folículos tireoidianos, unidade funcional da tireoide (CUNNINGHAM, 2008). Os folículos medem de 20 a 250 μm de tamanho (figura 2) (MCDONALD, 1969; VALA et al., 2013). Quando ocorre estímulo hormonal, os tireócitos adotam o formato alongado ou colunar, ampliando seu conteúdo e reduzindo o coloide, uma substância homogênea, viscosa, rica em tireoglobulina, a glicoproteína mais abundante da

glândula tireoide, que contém 115 resíduos de tirosina. A partir da iodação destes resíduos, são produzidos os HT (KÖHRLE, 1999; CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008).

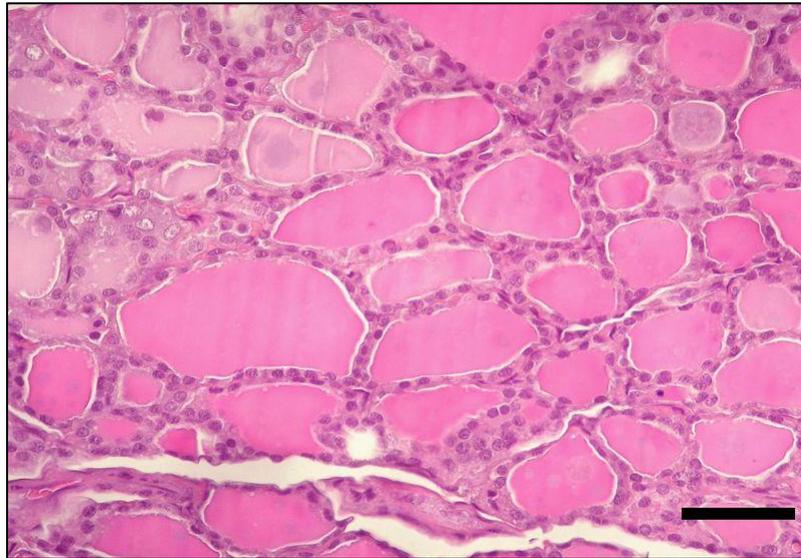


Figura 2. Folículos tireoidianos. Barra = 25 μ m. Fonte: VALA et al., 2013.

Além dos folículos tireoidianos produtores de T3 e T4, a glândula tireoide é composta também por células parafoliculares ou, simplesmente, células C, entremeadas em seu tecido intersticial. As células C sintetizam e secretam a calcitonina, um hormônio que atua na regulação do metabolismo de cálcio em ação antagonista ao paratormônio produzido e secretado pelas glândulas paratireoides (VALA et al., 2013).

2.2 Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide

A síntese e secreção dos HT depende de uma complexa inter-relação entre hipotálamo, adeno-hipófise e glândula tireoide que compreendem o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT), bem como outros fatores extrínsecos ao mesmo. Hipotálamo e hipófise são duas estruturas fundamentais que integram o sistema nervoso central. O primeiro está localizado na região ventral do diencéfalo, possivelmente um posicionamento privilegiado para exercer o papel de principal estrutura encefálica no controle neuroendócrino e autonômico. Dentre os núcleos hipotalâmicos associados ao controle da tireoide, é importante destacar o núcleo paraventricular (PVN). Este núcleo recebe projeções neuronais de um desmedido número de estruturas espalhadas por todo encéfalo, como o núcleo do trato solitário, hipocampo e amígdala, assim como de regiões desprovidas de barreira hemato-encefálica. No núcleo paraventricular hipotalâmico é sintetizado o hormônio liberador da tireotrofina (TRH). Este atinge a adeno-hipófise através da circulação porta-hipotalâmica-hipofisária provinda da eminência mediana. A partir da ativação de receptores de TRH situados na adeno-hipófise, ocorre a estimulação de diversos grupos celulares hipofisários para a síntese e secreção de seus produtos, como os lactotrofos e somatotrofos em algumas espécies (GALAS et al., 2009). Além disso, aferências neuronais hipofisiotróficas são originadas de diversas partes do cérebro, controlando o estado nutricional, temperatura corporal e participam, ainda, do ritmo circadiano (JOSEPH-BRAVO et al., 2015). Com relação ao eixo HHT, os tireotrofos

representam um fenótipo celular específico e também são estimulados para síntese e secreção do hormônio estimulador da tireoide (TSH) através de seus receptores. Este, por sua vez, atinge a corrente sanguínea e atua como secretagogo direto dos HT ao ligar-se em seus receptores localizados nas células foliculares da glândula tireoide. O TSH é uma glicoproteína composta por duas subunidades denominadas α e β . A subunidade α está presente em outros produtos glicoproteicos hipofisários como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio estimulador do folículo (FSH). Em contrapartida, a subunidade β difere entre os três, dando-lhes características particulares e espécie-específicas (PIERCE et al., 1971). Com relação à regulação do metabolismo de TSH, é descrito na literatura que a produção e liberação deste podem ser inibidas por ação de diversos outros hormônios, como dopamina, somatostatina e glicocorticoides (HAUGEN, 2009). Algumas destas aferências neuroendócrinas são detalhadas na figura 3.

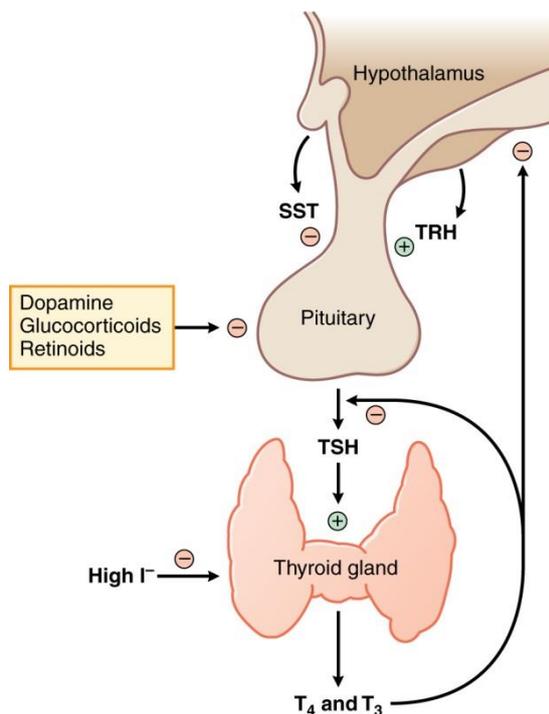


Figura 3. Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Fonte: GOODMAN; GILMAN, 2006.

No momento em que o TSH se liga aos seus receptores presentes na membrana basal dos folículos tireoidianos, tem-se início a síntese e secreção dos HT a triiodotironina (T3) e a tetraidodironina ou, simplesmente, tiroxina (T4). Estes, por conseguinte, irão também atuar regulando a atividade do eixo HHT através do mecanismo de retroalimentação nos mecanismos de transcrição de TSH, ainda que indiretamente, de acordo com sua disponibilidade plasmática e tecidual entre outros fatores (BECK-PECCOZ et al., 2006).

2.3 Hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos são compostos lipofílicos que são transportados ligados a proteínas carreadoras como albumina, transtiretina ou pré-albumina ligadora de tiroxina (TBPA), apolipoproteínas e, a principal delas, proteína ligadora de tiroxina (TBG) que carrega

cerca de 85% do hormônio ligado. Embora seja a forma livre que se ligue aos receptores de HT nos tecido alvo, apenas 1% desses hormônios circulam desligados de proteínas (SCOTT-MONCRIEFF, 2012). A fração ligada somada à fração livre compõe a concentração total de HT. Devido à forma ligada, a tiroxina pode ser liberada continuamente de acordo com a demanda tecidual. Embora haja grande afinidade de T4 para se ligar à TBG, cães apresentam apenas cerca de 15% da concentração plasmática desta proteína quando comparados a humanos (DAMINET; FERGUSON 2003). Gatos, por sua vez, não apresentam TBG (KAPTEIN et al., 1994). De modo geral, desta forma, cães e gatos apresentam maior concentração de T4 livre, isto é, não ligado a proteínas do que humanos, bem como menores níveis plasmáticos de T4 total (BIGLER, 1976; LARSSON, 1987). Além disso, este metabolismo hormonal é mais acelerado em animais domésticos, sendo a meia vida máxima de T4 cerca de 16 horas e de uma semana para humanos. Para T3, é descrito o máximo de 6 horas de meia vida em cães e 36 horas em humanos (FOX; NACHREINER, 1981; KAPTEIN et al., 1994), fato que explica a necessidade de maiores doses de reposição hormonal para estas espécies quando comparadas às doses habituais de tratamento de hipotireoidismo em humanos. Adicionalmente, em condições adequadas, é extremamente raro que cães desenvolvam tireotoxicose quando em terapia repositora de T4.

Dentre os HT, a 3-5-3-5-tetraiodotironina ou tiroxina (T4) é secretada em maior quantidade, embora a 3-5-3'-tri-iodotironina (T3) seja o hormônio com atividade biológica nuclear. Dessa forma, serão ativados ou inativados a depender da demanda tecidual. Assim sendo, os níveis de HT também atuam regulando atividade do eixo HHT via retroalimentação, tendo grande destaque o T3, uma vez que é o hormônio biologicamente ativo que inibe a transcrição dos genes reguladores da síntese de TSH (BECK-PECCOZ et al., 2006). Além disso, fatores nutricionais também fazem parte deste controle. Neste contexto, merece destaque a regulação exercida pela disponibilidade de iodo proveniente da dieta que também é de suma importância para a síntese de HT (HARIA; LUNIA 2013; CALIL-SILVEIRA et al., 2015). Dessa forma, fica claro que a manutenção da função adequada da tireoide, conhecida como eutireoidismo é dependente não somente do equilíbrio inerente ao eixo HHT como também de mecanismos extrínsecos ao eixo.

2.3.1 Síntese e Secreção dos Hormônios Tireoidianos

A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos depende da ligação de TSH em seus receptores situados na membrana basal das células foliculares da tireoide. A partir desta ligação, diversos mecanismos são desencadeados culminando com a produção dos HT (figura 4). Estes são, então, armazenados no coloide contido no interior dos folículos tireoidianos onde também está estocado o iodeto provindo da absorção da dieta. Por serem compostos iodados, a ingestão deste microelemento é fundamental para que os HT possam ser sintetizados (CALIL-SILVEIRA et al., 2015). Estudos mostram que o iodo regula a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à síntese de HT (UYTTERSROT et al., 1997; LEONI et al., 2008). Dessa forma, após sua absorção pelo trato gastrointestinal, a ligação de TSH ao receptor estimula a atividade do transportador de iodeto para que este atinja o interior do folículo tireoidiano. Este processo ativo promove também a entrada de sódio em sua forma iônica. É, portanto, uma etapa mediada por um co-transportador de sódio e iodeto presente na membrana basolateral dos tireócitos, o NIS. Ao penetrar no tireócito, o iodeto (I) chega à membrana apical através de um gradiente de concentração e, em parte, este efluxo apical é mediado pela proteína pendrina. Já no coloide, o iodeto que está em sua forma reduzida sofre ação da enzima tireoperoxidase (TPO) na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sendo

oxidado em um intermediário reativo que será incorporado em resíduos de tirosina da tireoglobulina, o iodo (I_2). A concentração deste elemento no coloide pode atingir um patamar até 200 vezes maior que o plasmático (DAMINET; FERGUSON 2003). O composto H_2O_2 é originado a partir de reações bioquímicas por ação da enzima dual-oxidase ou, simplesmente, DuOx. Este processo recebe o nome de organificação. Dessa forma, serão originadas as moléculas precursoras dos HT propriamente ditos, a moniodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT) que compreendem uma e duas moléculas de iodo, respectivamente. MIT e DIT são então excitados em direção ao coloide. De acordo com a ligação que ocorrer entre estes precursores, serão formados T3 (MIT + DIT) ou T4 (DIT + DIT). Para que haja a secreção de T3 e T4, a tireoglobulina é pinocitada e degradada por enzimas proteolíticas lisossomais. Em seguida, os produtos desta quebra enzimática podem retornar para o ciclo de formação dos HT, como é o caso das iodotirosinas (MIT e DIT) ou serem armazenados/excretados como as iodotironinas (T3 e T4). T4 é considerado um pró-hormônio devido a sua baixa atividade biológica. Em contrapartida, T3 é cerca de 4 a 5 vezes menos secretado embora seja o HT com maior atividade biológica (SCHOENMAKERS et al., 1992).

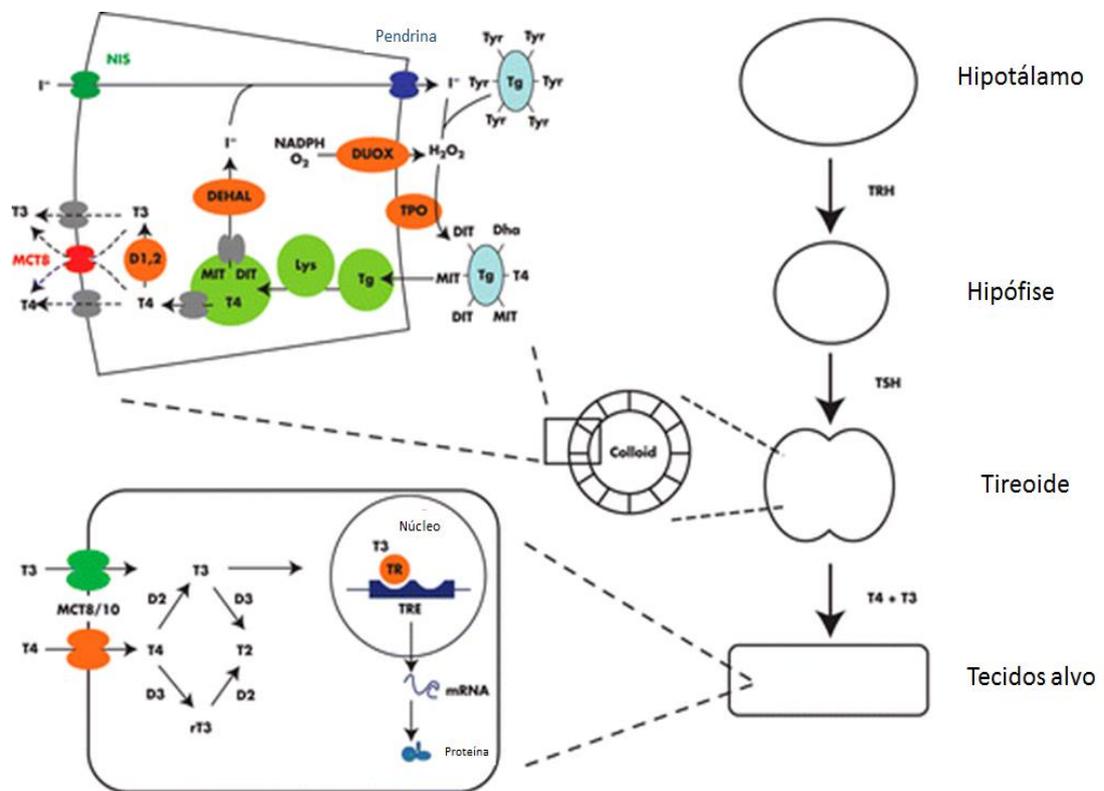


Figura 4: Visualização simplificada da síntese de HT, relação com eixo HHT e atuação em tecidos-alvo. Fonte: MEDICI et al., 2014.

2.3.2 Mecanismo de Ação dos Hormônios Tireoidianos

Os HT exercem diversos papéis em todo organismo, sendo descritas funções de homeostase, desenvolvimento, controle térmico, proliferação e diferenciação celular (WU; KOEING, 2000; RUDAS et al., 2005; ANTONINI et al., 2013). Eles aumentam, ainda, a oxigenação dos tecidos e promovem a termogênese (SCOTT-MONCRIEFF, 2012; ASTAPOVA, 2015). Dessa forma, aumentam a degradação de carboidratos e proteínas, bem como a excreção de nitrogênio e oxidação do tecido adiposo. Os efeitos biológicos clássicos

dos HT são mediados por receptores nucleares, sendo este mecanismo conhecido como ação genômica. Não obstante, a via genômica não é capaz de explicar completamente muitos efeitos gerados a partir da ação de HT. Neste contexto, atualmente é sabido que tanto T3 como T4 também atuam via mecanismo de ação não genômica, produzindo efeitos em poucos segundos por ativação de receptores de membrana e mitocondriais (BASSETT et al., 2003).

2.3.2.1 Ação genômica

Os efeitos biológicos genômicos dos HT são funções de T3 e dependem, portanto, em sua maior parte, da 5'-monodesiodação ou desiodação de T4, dando origem ao hormônio conhecido como biologicamente ativo, T3. Seus efeitos fisiológicos são mediados por receptores nucleares específicos para HT, conhecidos como TRs. Os TRs são pertencentes à superfamília dos receptores nucleares (NR), assim como os receptores dos hormônios esteroides e do ácido retinoico (YEN et al., 2006). Os membros da superfamília de NR estão ligados a regiões específicas do DNA, os elementos de resposta aos hormônios tireoidianos (TREs). Os receptores de HT necessitam se ligar ao DNA do gene alvo na forma de monômero, homodímero ou heterodímero. Geralmente, os receptores de HT formam um heterodímero com o receptor de retinoide X ou ácido retinoico (RXR) devido à maior afinidade entre estes dois receptores em comparação com os demais, garantindo maior estabilidade com o sítio TRE e, portanto, maior atividade transcricional (figura 5).

Concomitante à ligação de T3 aos TRs, ocorre a ligação de proteínas co-ativadoras ou co-repressoras. Estas últimas atuam independente da ação de T3, ou seja, se ligam ao complexo TR-TRE. Em contrapartida, as proteínas co-ativadoras são atraídas pela ligação de T3 aos TRs, desfazendo assim a ligação de proteínas co-repressoras (BRENT, 2012).

Em humanos, é descrita a expressão de TRs em queratinócitos epidérmicos, fibroblastos da pele, no músculo eretor de pelos, músculo liso, glândulas sebáceas, endotélio vascular, células de Schwann e em células que compõem o folículo piloso (SAFER, 2011). Em mamíferos, são conhecidos dois diferentes genes (THRA e THRB) que codificam dois tipos de receptor: TR α e TR β , cada um deles apresentando seus subtipos (TR α 1 e TR α 2; TR β 1, TR β 2 e TR β 3) (CHENG, 2010; TAYLOR; HAYLAND, 2017). Em mamíferos, de todos os subtipos de TRs, somente TR α 2 não apresenta sítio de ligação para T3. Entretanto, esta isoforma pode ocupar o sítio de TRE no DNA, impedindo a ligação das demais isoformas de TR. Assim sendo, entende-se que a expressão de TR α 2, na realidade, impede a ação de T3, influenciando na transcrição do gene alvo (BRENT, 2012).

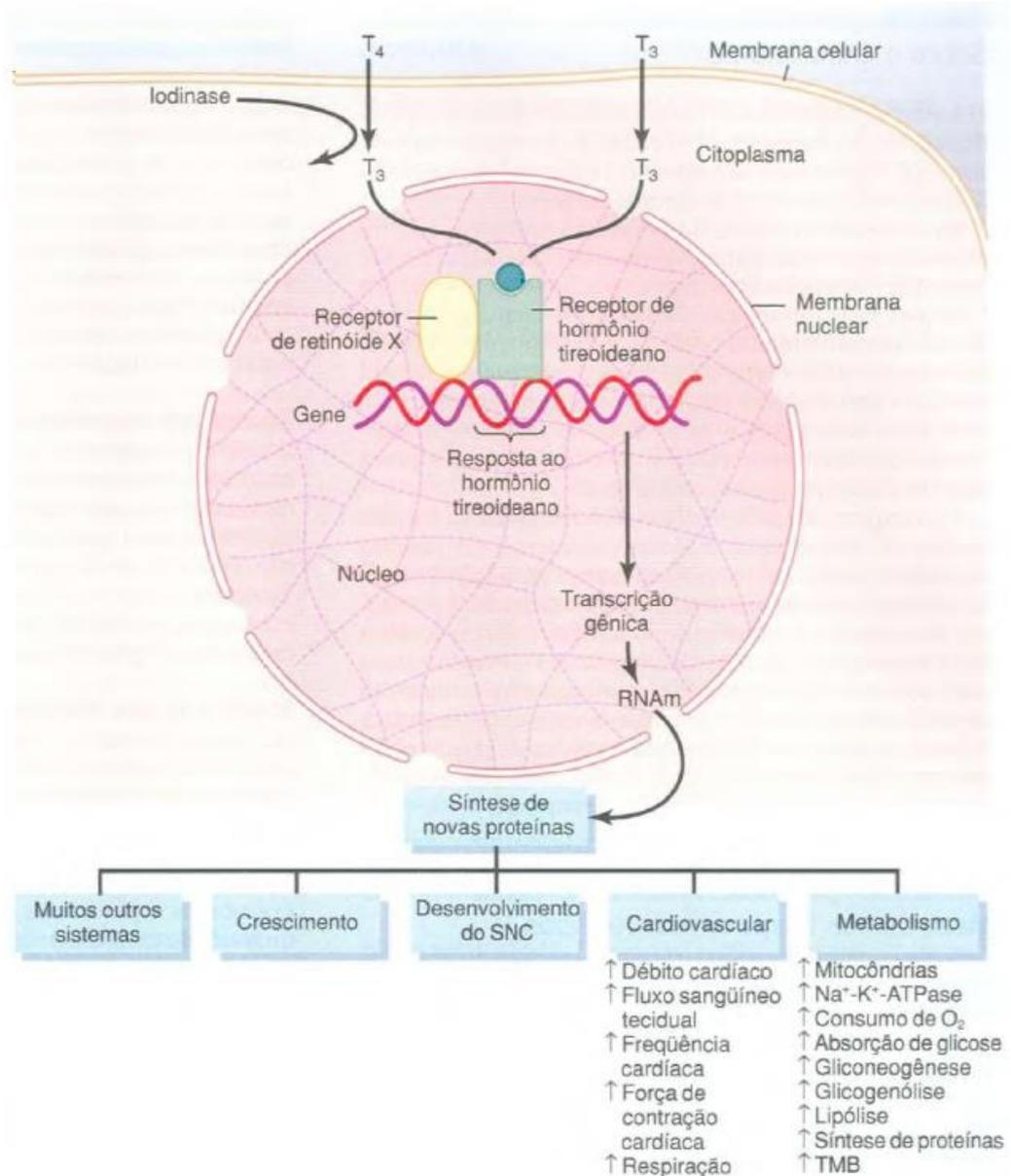


Figura 5. Esquema representativo da ativação de células-alvo pela ação genômica de HT. T3 e T4 são transportados para o meio interno celular. No citoplasma, T4 sofre desiodação, dando origem a T3. T3 atinge o núcleo e interage com o receptor de HT que está formando um heterodímero com o receptor de retinoide X no TRE. Esta ligação medeia a transcrição gênica que leva à formação de proteínas para variadas funções. São demonstradas ações de HT em diferentes sistemas. Fonte: GUYTON; HALL, 2006.

2.3.2.2 Ação não-genômica

Os HT exercem funções rápidas, em questão de minutos ou segundos. Esses efeitos são oriundos de sua ligação a receptores de membrana plasmática e mitocondriais e não envolvem TR nucleares. São importantes para regulação da atividade cardíaca e neuronal dada a sua velocidade, porém virtualmente todas as células podem responder a este estímulo extra nuclear de HT. A ação não-genômica dos HT pode ser exercida tanto por T3 como por

T4 após ligação a uma proteína de membrana heterodimérica, a integrina $\alpha V\beta 3$. Esta proteína tem como ligante clássico o peptídeo arginina-glicina-asparagina (RGD), mas a conformação espacial de seu sítio de ligação propicia a afinidade por T4, T3 e pelo ácido tetraiodoacético, o Tetrac, um metabólito biologicamente inativo de T4 que bloqueia o receptor integrina $\alpha V\beta 3$. Dessa forma, a ligação dos HT ao receptor de membrana, ativa a cascata de sinalização intracelular MAPK (figura 6). Por sua vez, esta cascata promove uma verdadeira interface entre a ação genômica e não-genômica dos HT, visto que esta via de sinalização intracelular aumenta a ativação de TRs nucleares. Outrossim, outros efeitos são atribuídos à ação não-genômica dos HT, a exemplo do metabolismo energético e muscular. Dentre os HT, o T4 é o que tem maior afinidade com o receptor de membrana, caracterizando assim importante papel de T4 além de sua condição de pró-hormônio quando comparado ao T3 (AIRES, 2008).

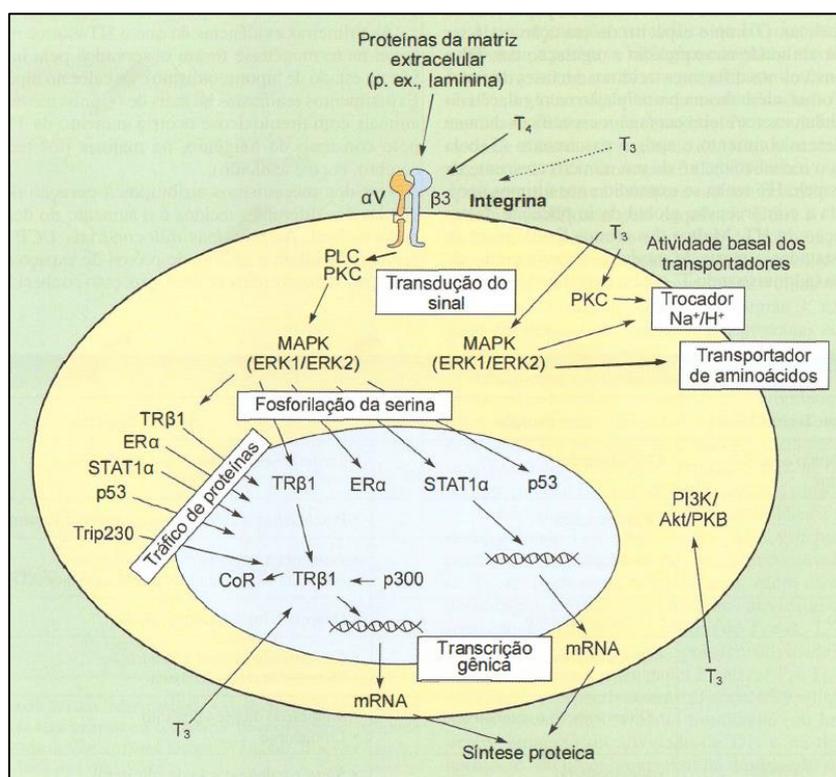


Figura 6. Esquema representativo da ação não-genômica do hormônio tireoidiano. A ligação de T4 e T3 com a proteína de membrana integrina $\alpha V\beta 3$ ativa a sinalização MAPK (ERK1/ERK2), que ativará uma série de proteínas (TRIB, ER α , STAT1 α) pela fosforilação de serinas que atuarão na mobilização das proteínas de tráfego, contribuindo indiretamente para a ação genômica do hormônio tireoidiano. Fonte: AIRES, 2008.

2.3.3 Metabolismo Extratireoidiano

A ação conjunta da regulação do eixo HHT e de etapas periféricas são fundamentais para a manutenção do equilíbrio hormonal plasmático e intracelular (BERNAL; MORTE 2005). Entre os elementos periféricos que participam do metabolismo extratireoidiano, estão os transportadores de HT, especialmente as famílias de transportadores de ânions orgânicos (OATP) e do monocarboxilato (MCT), tendo notoriedade a atividade do 8º membro desta família, o MCT8, no que tange a passagem de HT do meio extra para o intracelular (RUDAS

et al., 2005). Especificamente, em nível intracelular também há dependência de diversos fatores. É interessante ressaltar que cerca de 80% dos HT liberados pela glândula tireoide está na forma conhecida como pró-hormônio denominado tiroxina ou tetraiodotironina (T4) e a porcentagem restante liberada é biologicamente ativa, a 3-5-3'-triiodotironina (T3) (ADLER; WATORFSKY, 2007; WILLIAMS; BASSET, 2011). Portanto, para que os HT atuem, a conversão de T4 em T3 depende de mecanismos extratiroidianos desempenhados com fundamental papel por pequenas enzimas de membrana denominadas selenoproteínas desidases que participam da sinalização destes hormônios (GEREBEN et al., 2015). Este metabolismo tecidual é dependente da expressão e atividade destas enzimas (ELLIOTT et al., 2007), que variam de acordo com a disponibilidade local e também sistêmica de HT (RUDAS et al., 1994).

Até o presente momento, são descritas três isoformas de desidase com diferentes funções em todo o organismo (figura 7) (BIANCO, 2013). Estruturalmente, todas elas compreendem um único segmento transmembranar N-terminal conectado a um domínio citosólico globular maior com um centro ativo contendo selenocisteína incorporado em uma dobra semelhante à tioredoxina. Dentro da classificação proposta na literatura, é possível distingui-las em desidases tipo 1, 2 e 3.

A desidase do tipo 1 (D1) desempenha um papel ativador, convertendo T4 em T3 através da desidiação do anel fenólico ou externo da molécula de T4 (CHOPRA, 1977; KOHRLE, 1999). Esta enzima é expressa principalmente em fígado, rins, hipófise e tireoide (JANNY et al., 1998). Não obstante, D1 também é capaz de desidiar as moléculas de T4 através do seu anel tirosínico ou interno, dando origem a molécula de 3-3'-5'-tri-iodotironina ou T3 reversa (T3r), caracterizando seu papel inativador (GERMAN; GALTON 1997; BIANCO & KIM 2006), embora seja descrito que este mecanismo é menos eficiente (RUDAS et al., 2005). Estudos relatam que a atividade de D1 é estimulada em casos de hipertireoidismo e reduzida quando há hipotireoidismo (GEREBEN et al., 2008) e que sua atividade também é regulada pelo pH (RUDAS et al., 2005).

A desidase do tipo 2 (D2) é expressa em hipófise e hipotálamo, tecido adiposo marrom (BAT; *brown adipose tissue*), tecido muscular, placenta, tireoide (JANNY et al., 1998) e tecido cutâneo (DAMINET; FERGUSON, 2003; DENTICE et al., 2012) e atua somente por desidiação do anel externo, catalizando a conversão de T4 em T3, bem como T3r em T2 (RUDAS et al., 2005). Ao contrário do que ocorre com D1, D2 encontra-se com atividade reduzida frente ao hipertireoidismo e o revés ocorre nos casos de hipotireoidismo (GERMAN; GALTON, 1997). É interessante destacar ainda, sua pequena meia vida que reduz ainda mais quando há interação com a molécula de T4 (GEREBEN et al., 2015).

Por fim, a desidase do tipo 3 (D3) tem papel protetor dos tecidos por atuar exclusivamente de forma inativadora, isto é, limitando sua ação biológica. Seu efeito compreende na inativação de T4 e T3 por convertê-los em T3r e T2, respectivamente (BIANCO, 2002). Esta enzima é encontrada principalmente nos tecidos em desenvolvimento como sistema nervoso central, mas também é expressa em placenta e diversos tecidos fetais e, ainda, na pele (BIANCO, 2002; RUDAS et al., 2005). Este papel inibitório é fundamental para que haja o equilíbrio no balanço hormonal extratiroidiano. É importante destacar que o metabolismo inadequado dos HT pode refletir em alterações teciduais, como é o caso da exacerbação de lesões cutâneas por falha na ação ativadora de HT por parte de D2 (RUDAS et al., 1994).

Desta forma, é interessante ressaltar que as desidases não atuam antagonicamente, simplesmente ativando ou inativando os HT (GEREBEN et al., 2008). Estas enzimas exercem papéis colaboradores para que a homeostase tecidual seja garantida, podendo sofrer alterações em suas expressões e atividades mesmo diante de importantes alterações das concentrações plasmáticas de HT, como já descrito em mamíferos e aves (RUDAS et al., 2005). Assim

sendo, evidencia-se a importância do metabolismo periférico dos HT dependente da ação enzimática de selenoproteínas desiodases.

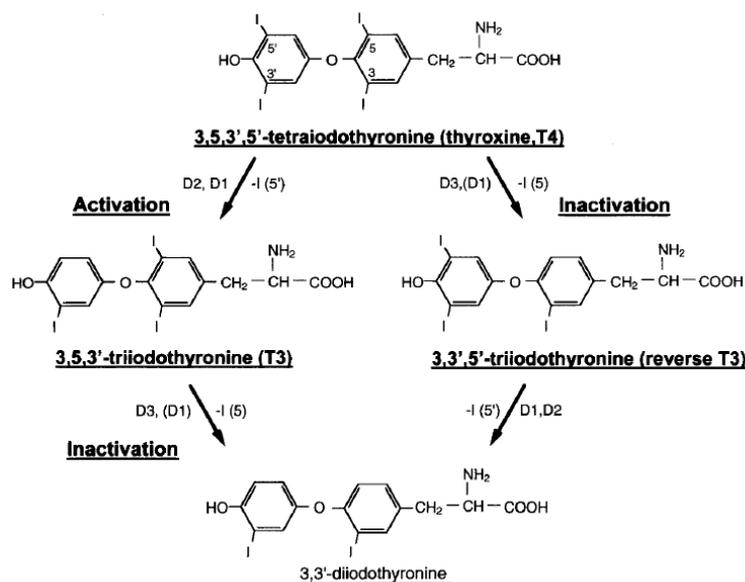


Figura 7. Estrutura química e inter-relação entre as principais iodotironinas ativadas ou inativadas pelas desiodases. Fonte: BIANCO et al., 2002.

Dentro deste contexto, vale ressaltar que diversos fatores podem estar envolvidos na perturbação da homeostase tireoidiana. Uma vez que existem vários mecanismos extratireoidianos do controle da ação dos HT, torna-se importante refletir que mesmo com a glândula tireoide intacta, é possível a falha no desempenho dos HT, seja por distúrbios das desiodases ou ainda por alteração na expressão dos receptores de HT.

2.4 Hipotireoidismo

O hipotireoidismo é considerado um distúrbio comum em cães causado pela combinação de fatores genéticos e ambientais (KANTROWITZ et al., 2001; BIANCHI et al., 2015). Todavia, sua prevalência não está bem definida na literatura (GRAHAM et al., 2007). A dificuldade em determinar a frequência desta endocrinopatia na clínica de pequenos animais está atrelada aos obstáculos enfrentados para, de fato, garantir que o diagnóstico esteja correto.

Trata-se de importante precedente de morbidades, acometendo principalmente cães entre 4 e 8 anos (SCARLETT, 1994), com destaque para aqueles em idade geriátrica (SCOTT-MONCRIEFF, 2012), ainda que possa ocorrer em qualquer fase da vida. Não obstante, sabe-se que as concentrações plasmáticas de T4 total, T4 livre e T3 tendem a ser reduzidas a partir dos 6 anos de idade, embora na maioria dos cães, mantenha-se dentro do valor de referência geral para a espécie (REIMERS et al., 1990; HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). Todavia, as razões para este declínio não estão esclarecidas (SCOTT-MONCRIEFF, 2012) e hereditariedade pode estar relacionada (MOONEY, 2011) similarmente ao que ocorre

na tireoidite de Hashimoto em humanos (BEIERWALTES et al., 1968). Além disso, estudos mostraram que quanto maior o porte do animal, menores são as concentrações plasmáticas de HT (REIMERS et al., 1990). A respeito da predisposição racial, os cães de médio a grande porte parecem predispostos (SCARLETT, 1994), sugerindo a possibilidade de fatores genéticos estarem envolvidos no desenvolvimento da doença. Existem diversas publicações incluindo Goldens Retrievers, Cocker Spaniel, Beagle, Poodle, Boxer, Doberman, entre outros, como raças predispostas ao hipotireoidismo (BIANCHI et al., 2015; ÅHLGREN; UIMARI 2016).

Na literatura, estudos mais antigos não definem a predileção entre os sexos (REIMERS et al., 1990). Conquanto, análises mais recentes sugerem padrões hormonais cada vez mais específicos. Por exemplo, as fêmeas podem ter concentrações médias de T4 total e livre naturalmente mais elevadas quando comparadas aos machos (HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). Outrossim, alguns autores referem que não há diferenças estatísticas nas concentrações de TSH em cães hípidos (HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). Além disso, animais submetidos à gonadectomia parecem ser predispostos, embora os estudos que abordam este tema não sejam consistentes (SCOTT-MONCRIEFF 2012; KRZYZEWSKA-MLODAWSKA et al., 2014).

2.4.1 Etiologia

A despeito da etiologia, qualquer nível do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT) pode ser responsável pelo hipotireoidismo (DAMINET; FERGUSON, 2003; VOORBJI et al., 2015). Didaticamente, esta endocrinopatia pode ser dividida em congênita ou adquirida. Não obstante, a forma congênita do hipotireoidismo, o cretinismo, é rara em animais e foi pouco descrita (MOONEY, 2011; SCOTT-MONCRIEFF, 2012). Esta forma pode estar relacionada à agenesia, disgenesia ou dishormogênese e, geralmente, resulta em morte precoce (FELDMAN; NELSON, 2004). Em contrapartida, o tipo adquirido é comum e pode ser subdividido em central e primário. A forma central pode advir de dois mecanismos etiopatogênicos distintos: (1) distúrbio hipotalâmico (também chamado de hipotireoidismo terciário). Este tipo foi descrito na literatura em apenas um caso em cão (SHIEL et al., 2007); ou (2) deficiência hipofisária (conhecido como hipotireoidismo secundário). A forma congênita foi descrita em cães apenas em uma família de Schnauzers gigantes (GRECO et al., 1991) e um Boxer (MOONEY; ANDERSON, 1993). Geralmente, esta condição está associada a crescimento anormal e outras deficiências hipofisárias (FRANK, 2006). Mais comumente, esta forma pode, ainda, ocorrer devido à deficiência da glândula hipófise em sintetizar e secretar TSH por efeitos extrínsecos ao eixo HHT, como a ação de outros hormônios, como glicocorticoides (KAPTEIN et al., 1992). Além disso, os glicocorticoides sejam eles endógenos ou exógenos são capazes de interferir na ligação entre T4 e TBG, bem como reduzir a desiodação periférica de T4 em T3. Trata-se de um mecanismo reversível, pois é dependente da manutenção da hipercortisolemia, ou seja, quando esta condição é controlada, a inibição do eixo HHT cessa (KAPTEIN et al., 1992). Na verdade, diversas drogas já foram apontadas como redutoras da concentração plasmática de HT. Entre elas, destacam-se fenobarbital, propranolol, carprofen e sulfonamidas. Esta última pode inclusive promover sinais clínicos de hipotireoidismo em cães (DAMINET; FERGUSON, 2003).

Dentre as possíveis origens de hipotireoidismo, descreve-se em cães a forma primária como a mais comum (DAMINET; FERGUSON, 2003). O mecanismo de ativação da destruição da tireoide não está completamente elucidado, mas é sabido que glândula sofre ação de um distúrbio imunomediado denominado tireoidite linfocítica, um distúrbio

semelhante à tireoidite linfocítica crônica que acomete humanos, também conhecida como tireoidite de Hashimoto (GOSSELIN et al., 1982; BIANCHI et al., 2015). A tireoidite linfocítica envolve respostas imunes humoral e celular, mas é, classicamente, caracterizada pelo infiltrado de linfócitos T e B na glândula tireoide, bem como pela presença de auto-anticorpos anti-tireoglobulina (TgAA) ou anti-tireoperoxidase (anti-TPO), resultando no processo de destruição do parênquima tireoidiano (BEIERWALTES; NISHIYAMA, 1968; LUCKE et al., 1995; SKOPEK et al., 2006; GRAHAM 2007). Adicionalmente, alguns autores questionam o papel da imunização artificial na indução desta condição (SCOTT-MONCRIEFF et al., 2002). Estudos referem que, em cães, o pico de detecção de TgAA ocorra entre 2 e 4 anos de idade e que a severidade e progressão da tireoidite dependa de diversos fatores, incluindo a raça (GRAHAM et al., 2007). Para o desencadeamento desta doença autoimune, fatores genéticos e ambientais também vêm sendo apontados como importantes pilares (MOONEY, 2011). Há ainda, a possibilidade de ocorrer atrofia idiopática, todavia estudos não foram capazes de definir se este é apenas um estágio final do processo imunomediado ou uma condição isolada (MOONEY, 2011).

2.4.2 Avaliação dos sinais clínicos

A sintomatologia do hipotireoidismo canino é bastante diversificada, assim como em humanos (DIXON et al., 1999), refletindo a ampla ação destes hormônios no organismo (PANCIERA, 1994). Merecem destaque aqueles relacionados à redução da taxa de metabolismo basal, como fadiga (SCOTT-MONCRIEFF, 2007), distúrbios metabólicos, como ganho de peso e as diversas dermatopatias (PANCIERA, 1994; DIXON et al., 1999). É interessante destacar que a obesidade não está relacionada à polifagia sendo, portanto, atribuída à menor demanda energética durante o hipotireoidismo (FRANK, 2006). Além disso, embora as alterações cutâneas estejam presentes em até 80% dos casos em cães (SCOTT-MONCRIEFF, 2012), é importante ressaltar que os mecanismos pelos quais elas ocorrem não estão elucidados (SLOMINSKI et al., 2002). Outros sinais como confusões mentais, bradicardia e termofilia também são relatados (SCOTT-MONCRIEFF, 2012).

2.4.2.1 Síndrome do Eutireoideo doente

A síndrome do eutireoideo doente, também conhecida como síndrome da doença não tireoidiana compreende diversos fatores que isoladamente ou em conjunto são capazes de reduzir os níveis plasmáticos de hormônios tireoidianos, bem como seu metabolismo e/ou transporte sem que haja comprometimento glandular estrutural (DAMINET; FERGUSON 2003). Dessa forma, os níveis circulantes de TSH podem ser encontrados dentro dos valores de referência para a espécie, ou, em alguns casos, ligeiramente abaixo da mesma, mimetizando o hipotireoidismo central (ADLER; WATORFSKY, 2007). Com relação à mensuração de HT, esta síndrome se caracteriza por baixos níveis de T3, baixos ou normais níveis de T4 e altos níveis de T3r (ADLER; WATORFSKY, 2007). Tal paradigma já é bem relatado em medicina, sendo descrito em média em 75% dos pacientes hospitalizados. Em medicina veterinária, não há relatos quanto a este impacto. Este processo pode ocorrer devido a doenças crônicas, perturbações à homeostase transitórias, como distúrbios agudos em questão de horas ou, ainda, desafios terapêuticos diversos (ADLER; WATORFSKY, 2007). Em medicina veterinária, recebe destaque o uso de fenobarbital, corticosteroides e sulfonamidas (DAMINET; FERGUSON, 2003). É importante estar atento à

possibilidade desta síndrome ser encarada como um fator preditivo de comorbidades, podendo indicar a severidade de doenças críticas (LECHAN, 2008). Alguns autores apontam que a redução dos níveis T4 a um valor abaixo de 4µg/dl pressupõe risco de morte de cerca de 50% e, caso esse valor reduza para menos de 2µg/dl, o risco pode chegar a 80% (LECHAN, 2008).

2.4.2.2. Concentração de Iodo na dieta

A dieta contendo iodo de forma adequada favorece a formação de T3 e T4. Vale destacar que a necessidade diária de iodo para o cão é de 150 a 200µg (CHASTAIN; GANJAN, 1986). Outrossim, diante da escassez do mesmo, a glândula tireoide exerce um papel autorregulatório, dando origem a mais moléculas de T3 do que de T4. Por outro lado, o excesso de iodo também induz outro mecanismo autorregulatório denominado efeito Wolff-Chaikoff. É descrito que diante grandes concentrações iodo, alguns mecanismos de síntese e secreção de HT são freados de forma transitória a fim de regular os níveis destes hormônios. Dessa forma, tanto a atividade quanto a expressão da enzima TPO e do co-transportador NIS são reduzidas (ENG et al., 2001; SERRANO-NASCIMENTO et al., 2012), bem como mecanismos de secreção de HT, fazendo com que a glândula armazene por mais tempo seus produtos no coloide (DE SOUZA et al., 2015). Não obstante, embora não seja completamente compreendido, a literatura cita outro efeito regulatório, chamado escape do efeito Wolff-Chaikoff. Ambos os mecanismos são importantes para manter a síntese de HT sob controle, bem como para proteger o organismo contra o excesso de iodo (BURGI, 2010). Neste contexto, alguns autores (CASTILLO et al., 2001) apontam que a alta concentração de iodo nas dietas comerciais para cães pode induzir o hipotireoidismo na espécie.

2.4.3 Diagnóstico do Hipotireoidismo

Semelhante ao que ocorre na maioria das endocrinopatias, o diagnóstico do hipotireoidismo é o resultado do somatório dos dados do histórico do paciente, sinais clínicos, exame físico, análises laboratoriais e testes endócrinos (PANCIERA, 1997; SCOTT-MONCRIEFF, 2012; HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). Outrossim, inúmeras doenças crônicas, fármacos e idade avançada podem induzir a redução da liberação dos hormônios tireoidianos (HT), bem como interferir no transporte e ativação periférica. É descrita na literatura, a incapacidade dos tecidos periféricos em converter T4 a T3, possivelmente, devido à deficiência da 5'-monodesiodase (FELDMAN; NELSON 2004).

Há ainda a grande questão pertinente com relação aos valores de referência dos testes de avaliação da função tireoidiana. Há alguns anos, inúmeros estudos em cães vêm sendo publicados com objetivo de questionar os valores de referência para os HT atualmente utilizados (BEALE et al., 1992; BODEY; RAMPLING, 1999; VAN GEFFEN et al., 2006; SHIEL et al., 2007; PANACOVA et al., 2008; SEAVERS et al., 2008; SHIEL et al., 2010; LAVOUÉ, et al., 2013; HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). Até o presente momento, há poucos estudos específicos sobre as raças, embora sejam sabidamente importantes (BODEY; RAMPLING, 1999; HEGSTAD-DAVIES et al., 2015) e possam auxiliar a refinar a análise diagnóstica.

Os atuais valores de referência utilizados por laboratórios representam possíveis falhas importantes no atual diagnóstico do hipotireoidismo em cães, visto que a análise racial dos intervalos de referência (IR) é muito mais precisa quando comparada aos IR de cães de um modo geral (HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). Portanto, o clínico deve estar muito atento diante do diagnóstico positivo para hipotireoidismo, devendo ainda confirmar o diagnóstico

com a resposta terapêutica (SCOTT-MONCRIEFF, 2012). Não obstante, o animal pode apresentar sinais clínicos compatíveis com hipotireoidismo ainda que a glândula tireoide esteja preservada. Quando os níveis de HT encontram-se abaixo da referência de forma secundária, este paciente recebe o nome de eutireoideo doente e esta condição é bastante frequente na clínica. Devido a esta série de obstáculos, o hipotireoidismo é há anos a endocrinopatia mais comumente hiperdiagnosticada (PANCIERA, 1998; CREDILLE et al., 1996; SCOTT et al., 2001; GROSS et al., 2005; PARRY 2013). Para minimizar este problema, atualmente, a indicação mais aceita entre os médicos veterinários é a correção prévia de outros distúrbios que tenham sido detectados concomitantemente à presença de sinais clínicos compatíveis com hipotireoidismo (LECHAN et al. 2008; PARRY, 2013). Desta forma, consegue-se reduzir as chances de diagnosticar erroneamente um paciente hipotireoideo quando, na verdade, pode se tratar de um eutireoideo doente.

Em 2011, Castillo e coautores classificaram o hipotireoidismo em cães em clínico e subclínico, tendo cada uma das classificações subdivisões em fases como demonstra a tabela 1. Dessa forma, segundo os autores, é possível identificar a fase da doença em que o animal se encontra facilitando a decisão quanto à instituição do tratamento ou acompanhamento clínico e laboratorial.

Tabela 1: Classificação do hipotireoidismo segundo CASTILLO et al., 2011.

	Estímulo de TRH ou TSH	TSH	T4 (total ou livre)	T3
Hipotireoidismo subclínico				
Fase 1	Hiper-responsividade	Normal	Normal	Normal
Fase 2	Não responsável	Aumentada	Normal	Normal
Hipotireoidismo clínico				
Fase 1	Não responsável	Aumentada	Diminuída	Normal
Fase 2	Não responsável	Aumentada	Diminuída	Diminuída

2.4.3.1. Patologia clínica

No que se refere às alterações clínico-patológicas, o paciente com déficit tiroidiano apresenta resultados inespecíficos, mas que podem afunilar a busca pelo diagnóstico correto do hipotireoidismo, uma vez que existem alterações frequentemente compatíveis. Outrossim, algumas doenças podem ser descartadas ou incluídas entre os diagnósticos diferenciais devido aos resultados encontrados em exames corriqueiros como hemograma e bioquímica básica de função renal, hepática e lipidograma (MOONEY, 2011).

Com relação às alterações laboratoriais comuns no hipotireoidismo, destaca-se a anemia normocítica normocrômica não regenerativa, aumento sérico de enzimas hepáticas e dislipidemias (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia) (SCOTT-MONCRIEFF, 2012).

Os HT atuam diretamente na medula óssea, mediando a hematopoiese. Embora este mecanismo de interferência ainda seja controverso (VARALLO et al., 2004), no hipotireoidismo, a produção de hemácias pode ser comprometida contribuindo para a anemia. Igualmente, a redução da demanda periférica de oxigênio induz à queda na produção de eritropoetina, favorecendo mais ainda o quadro (MARK et al., 2008).

O metabolismo de lipídeos e carboidratos está intimamente relacionado com a ação de HT. Eles regulam a síntese de colesterol e potencializam a degradação hepática deste em

ácidos biliares, logo, a redução dos níveis de HT cursa com acúmulo de lipídeos na circulação (PESSINA et al., 2014). Nos animais hipotireoideos, embora a síntese de lipídeos também esteja comprometida, a redução da degradação dessas moléculas prevalece, predispondo o acúmulo de colesterol e triglicerídeos no plasma (DIXON et al., 1999). Estes compostos são transportados ligados a lipoproteínas de baixa (LDL) e, principalmente, de alta densidade (HDL) que carregam colesterol e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) que têm afinidade por triglicerídeos (BAUER, 1997). A hipercolesterolemia é descrita em até 75% dos cães com hipotireoidismo (PANCIERA, 1998; DIXON et al., 1999; PESSINA et al., 2014). Embora a aterosclerose seja incomum em cães hípidos, nos animais hipotireoideos este padrão é muito frequente com elevação da concentração plasmática de LDL e VLDL (HESS et al., 2003), associada à redução da metabolização e da expressão de receptores hepáticos de LDL, a principal lipoproteína carreadora de colesterol (DIXON *et al.*, 1999; SCOTT-MONCRIEFF et al., 2007). Além disso, resistência insulínica já foi demonstrada experimentalmente em cães com hipotireoidismo (HOFER-INTEEWORN et al., 2012), bem como foi sugerida a resistência à adiponectina, um hormônio produzido exclusivamente pelo tecido adiposo que controla a formação da aterosclerose (MAZAKI-TOVI et al., 2015). A respeito do aumento sérico de triglicerídeos, a literatura descreve sua relação com a redução de *clearance* devido à baixa concentração plasmática de HT (SIMPSON; VAN DEN BROEK, 1991).

Outras alterações podem ser compatíveis com hipotireoidismo no painel bioquímico de um paciente suspeito, porém são menos frequentes e menos específicas. Sua importância está relacionada à busca por diagnósticos concomitantes ou diferenciais. Entre elas, o aumento da atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA) e γ -glutamil transferase (GGT) ocorrem em até 30% dos casos devido à deposição de lipídeos no fígado, cursando com discreta lipidose (DIXON et al., 1999).

2.4.3.2 Testes hormonais

Apesar de haver diversos testes disponíveis para o diagnóstico de hipotireoidismo, não há um exame ouro usual na detecção deste distúrbio, uma vez que todos os testes existentes apresentam falhas na especificidade e/ou sensibilidade (PARRY, 2013). Ademais, é consenso que a interpretação dos resultados de dosagens hormonais necessita estar associadas ao estado clínico do paciente diante da suspeita de hipotireoidismo. Somado a este fato, a resposta terapêutica é indicado por alguns autores para fechar o diagnóstico da doença (FERGUSON, 2007; SCOTT-MONCRIEFF, 2012). Independente do desafio diagnóstico, sabe-se que a dosagem de T3 total (T3t) não é recomendada para diagnosticar deficiência na produção tireoidiana, pois este teste é muito pouco específico, ou seja, o nível de triiodotironina pode estar diminuído em pacientes portadores de doenças não tireoidianas, embora este frequente mecanismo não esteja bem compreendido (PARRY, 2013). Ademais, a maior fração de T3 circulante é oriunda da desiodação periférica, não representando, portanto, a função tireoidiana fidedigna (MATAMOROS et al., 2002). Com relação à mensuração de T4 total (T4t), a literatura descreve este teste como bastante sensível, porém com responsividade a doenças não tireoidianas, como ocorre com T3t, ou ainda em resposta a diversos tratamentos como terapia com corticosteroides, antibióticos, anti-inflamatórios não esteroidais, anticonvulsivantes, entre outros (MOONEY, 2011). Todavia, dada a sua sensibilidade, pode ser indicado como teste de triagem (SCOTT-MONCRIEFF, 2012). Comparativamente, a dosagem de TSH também pode revelar valores dentro da referência em resposta a inúmeros tratamentos. O teste de mensuração de TSH é pouco sensível, embora sua especificidade aumente quando utilizado em conjunto com outros testes, como o T4t, por exemplo, ou T4

livre (MATAMOROS et al., 2002; BEHREND, 2005; MOONEY, 2011; PARRY, 2013). Além desta, outras associações são apontadas como refinadoras do diagnóstico de hipotireoidismo, como é o caso de T4t associado ao T4 livre (T4l). De acordo com Rasmussen e colaboradores (2014), os resultados destes dois métodos somados garante maior acurácia na determinação da doença. Não obstante, a combinação de T4l com TSH é, atualmente, a opção de eleição para diagnóstico de hipotireoidismo em cães, sendo positivo para hipotireoidismo primário quando T4l se encontra abaixo do nível mínimo normal e TSH, devido à retroalimentação negativa, acima do limite máximo (MATAMOROS et al., 2002). Não obstante, é descrito em cães a secreção pulsátil de TSH o que, segundo alguns autores, deprecia o uso da dosagem de TSH como método de diagnóstico (KOOISTRA et al., 2000) visto que em muitos casos o resultado não é fidedigno, chegando a variação de 30 a 60% de sensibilidade na literatura (SCOTT-MONCRIEFF, 2012). O que torna a distinção entre doença tireoidiana e doença não tireoidiana impossível, pois ambas podem apresentar o mesmo perfil de resultado, ou seja, T4l abaixo dos valores de referência e TSH dentro da normalidade (DAMINET; FERGUSON, 2003). Em contrapartida, a dosagem de T4 livre parece não sofrer influência de doenças não tireoidianas. Entretanto, semelhantemente ao que ocorre com os níveis de TSH, T3t e T4t, o nível de T4 livre também sofre redução quando o paciente é submetido a algumas terapias (DIXON et al., 1996). Para minimizar possíveis influências, é importante ressaltar que o exame de T4 livre deve ser realizado pelo método de diálise de equilíbrio, desta forma, torna-se o teste mais fidedigno para o diagnóstico de hipotireoidismo, embora ainda possam ocorrer falhas (RANDOLPH et al. 2015). Já com relação às técnicas empregadas para mensuração plasmática de hormônios, houve grande avanço em medicina veterinária. Segundo diversos autores, dentre as metodologias disponíveis, a técnica de radioimunoensaio é a que confere maior acurácia em detrimento das demais (RANDOLPH et al. 2015) devendo ser preferida sempre que possível.

A respeito da utilização das relações T4t/TSH e T4l/TSH a literatura refere que não há aprimoramento na acurácia do diagnóstico com esta metodologia (ESPINEIRA et al., 2007). Dentre os testes endócrinos existentes, o teste de estimulação com TSH é o menos contestável. Tal teste consiste em comparar valores de T4t antes e após a aplicação de TSH. Objetiva-se neste caso, mensurar o pico de secreção de T4 diante de sua máxima estimulação, uma vez que é injetado o seu secretagogo direto, isto é, sem intermediários. O tempo ideal para a segunda coleta é a hora 8 após aplicação endovenosa, sendo a dose recomendada 150µg/animal para a obtenção de melhores resultados capazes inclusive de distinguir doenças tireoidianas de não tireoidianas (CAMPOS et al., 2012). O hipotireoidismo é descartado caso a variação entre as dosagens pré e pós TSH seja menor que 1,5 vezes (BORETTI et al., 2009). Para resultados de T4t acima de 2,5 µg/dl, o resultado também é considerado negativo para a endocrinopatia (SCOTT-MONCRIEFF, 2012). Qualquer dos outros testes previamente citados demonstram dificuldade em diferenciar animais com hipotireoidismo primário daqueles com doença não tireoidiana, ou eutireoideos doentes, especialmente em fases iniciais do hipotireoidismo (ROOVER et al., 2006). Assim como em humanos, inicialmente em cães era utilizado o TSH bovino. Esta opção caiu em desuso devido aos diversos efeitos adversos provocados, como anafilaxia. Além disso, surgiu em seguida o TSH recombinante humano (rhTSH), uma glicoproteína dimérica produzida a partir da tecnologia de recombinação de DNA. Esta molécula não foi apontada como causadora de nenhum efeito adverso em nenhuma das duas espécies, sendo apenas dor local após aplicação quando realizada por via intramuscular o único relato e cães (SAUVÉ; PARADIS, 2000). A partir de então, o rhTSH é o hormônio de escolha para a realização do teste de estimulação com TSH tanto em humanos como em cães. Não obstante, o custo de um frasco de rhTSH desestimula o uso rotineiro do exame (DIXON et al., 1996). Outrossim, seu armazenamento é possível por no máximo dois meses após reconstituição sob a temperatura de -20°C sem perder atividade biológica

(BEHREND, 2005; ROOVER et al., 2006). Este dado, portanto, ratifica a dificuldade de atestar o diagnóstico de hipotireoidismo em cães na rotina clínica.

2.4.3.3 Histopatologia Cutânea

O tecido cutâneo é considerado um importante órgão periférico neuro-endócrino-imune. Células especializadas na pele produzem e respondem a múltiplos neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios caracterizando este tecido como fundamental na homeostase hormonal. Além disso, de acordo com os desafios homeostáticos, a pele pode se adaptar e se modificar, adquirindo características histológicas particulares (ANTONINI et al., 2013).

Embora muitos clínicos utilizem como ferramenta no diagnóstico de hipotireoidismo em cães, as alterações histológicas da pele são inconsistentes e contraditórias (ROSYCHUK, 1997). Algumas delas podem ser causadas pela ação direta dos HT ou indireta através da atividade em outros tecidos, bem como por efeitos imunomediados decorrentes de etiologias autoimunes (SAFER, 2011). Não obstante, algumas características teciduais são frequentemente observadas e, embora muitas delas possam estar presentes em diversas outras endocrinopatias, o resultado histológico compatível pode ser auxiliar no diagnóstico. Mais que isso, a histopatologia tegumentar pode ajudar na exclusão de outras doenças de pele que possam, por exemplo, serem concomitantes ao hipotireoidismo em cães (SCOTT et al., 2001). Dessa forma, é importante que o avaliador entenda que alguns achados podem estar relacionados à superposição de características histológicas entre as doenças, como inflamação e acantose (SCOTT et al., 2001). Como características histológicas de doenças hormonais, de forma geral, é possível descrever hiperqueratose ortoquetatótica, dilatação e atrofia foliculares, atrofia de glândulas sebáceas, aumento da concentração de pelos em fase telogênica, melanose epidérmica e excesso de queratinização tricolemal. Dentre as alterações mais comuns no tegumento do cão hipotireoideo, destaca-se o importante número de pelos telogênicos e folículos em kenógeno (figura 8). Esta condição se estabelece uma vez que os HT são fundamentais na ativação da fase anagênica dos pelos. Todavia, alguns autores apontam que este paradigma nem sempre seja observado em cães doentes (CREDILLE et al., 2001).

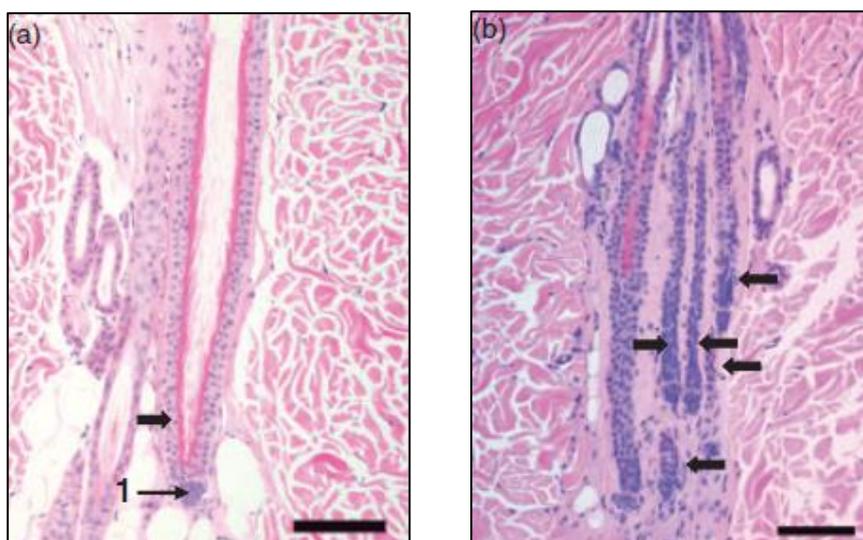


Figura 8. (a) Folículo em telógeno contendo um eixo do pelo (seta grossa). Observe a posição da papila dérmica (seta 1); (b) Vários folículos kenogênicos (flechas grossas). HE. Barra = 100 μ m. Fonte: MÜNTENER et al., 2012.

O hipotireoidismo, assim como outras doenças endócrinas, também pode cursar com atrofia cutânea, associada a leve paraqueratose (ROJKO et al., 1978). Além disso, a hiperqueratose também é descrita em cães com hipotireoidismo. Outra característica recorrente é o mixedema, isto é, a separação das fibras colágenas da derme com deposição de material basofílico semelhante à mucina (ROJKO et al., 1978), espessamento da derme, bem como a hipertrofia a vacuolização do músculo eretor do pelo (figura 9) (SCOTT et al., 2001). Esta última alteração é descrita na literatura como provinda de um mecanismo de defesa contra a termofilia inerente ao hipotireoidismo. Segundo estes autores, os pelos são eriçados principalmente na linha dorsal para que haja a formação de uma camada de ar entre os pelos, auxiliando na termorregulação, com objetivo de diminuir a perda de calor nestes animais. Como esta condição é frequente em cães com hipotireoidismo, haveria uma intensa exigência deste músculo, culminando com a hipertrofia do mesmo (SCOTT et al., 2001).

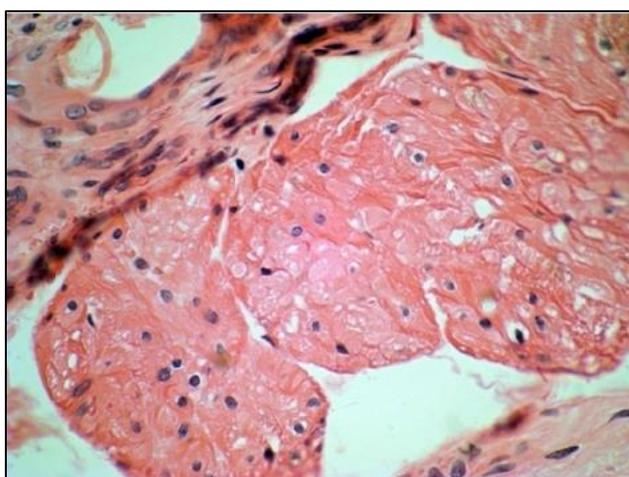


Figura 9. Moderada vacuolização (vacúolos preenchidos por substância eosinofílica) de músculo piloerector da pele da região cervical. HE, Obj. 25X. Fonte: GONZÁLEZ et al., 2016.

2.4.3.4 Histopatologia da tireoide

O exame histológico a partir de uma biópsia de tireoide é dito como a avaliação mais sensível para detectar doenças tireoidianas, evidenciando a tireoidite linfocítica e/ou atrofia folicular (ESPINEIRA et al., 2007). Além disso, facilmente distingue o hipotireoidismo primário do secundário. Histologicamente, nota-se infiltrado multifocal a difuso de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Na fase final, a inflamação é substituída pela atrofia folicular e tecido cicatricial (FRANK, 2006). No hipotireoidismo no qual a tireoide não é diretamente afetada, ocorre acúmulo de coloide com distensão dos folículos e achatamento dos tireócitos (SCOTT et al., 2001). Não obstante, é importante destacar que alguns autores descrevem que a presença dessas alterações na glândula não necessariamente reflete em anormalidade funcional (GRAHAM et al., 2001). Portanto, é possível entender que submeter um animal à biópsia de tireoide, procedimento invasivo, não garante a confirmação do diagnóstico e, portanto, não deve ser incentivado como um protocolo rotineiro.

2.4.3.5 Diagnóstico por imagem

Os exames de imagem são descritos na literatura como auxiliares no diagnóstico de hipotireoidismo (DE MARCO; LARSSON, 2006), tendo em vista algumas características compatíveis com a endocrinopatia. Todavia, é importante ressaltar que, mais uma vez, se tratam de testes de triagem para hipotireoidismo, bem como auxílio no descarte de diagnósticos diferenciais.

A ultrassonografia da glândula tireoide é um método bastante utilizado em medicina para a suspeita de diversas afecções da glândula, como disgenesia, hipotireoidismo por tireoidite linfocítica e neoplasias (KREISNER et al., 2003). Ao exame ultrassonográfico, a tireoide apresenta redução de volume e tende a se apresentar hipocogênica (SCOTT-MONCRIEFF, 2012). O teste de ultrassom se mostrou eficaz por ser exame rápido e não invasivo (DE MARCO; LARSSON, 2006; TAEYMANS et al., 2007) e ainda, por auxiliar no diagnóstico de hipotireoidismo, contribuindo para a diferenciação de casos de eutireoideos doentes, sobretudo nos resultados de teste hormonais dúbios (BRÖMEL et al., 2005).

A cintilografia nuclear com captação de iodo não é muito utilizada na rotina clínica devido à estrutura e custo que requer (DANIEL; NEELIS, 2014). Apesar de ser muito útil em casos de neoplasia tireoidiana ou no hipertireoidismo em felinos, a captação de iodo pela tireoide atrofiada é muito baixa, problematizando sua aplicação para a pesquisa de hipotireoidismo (BALOGH et al., 1998).

2.4.3.6 Avaliações imunológicas

Os testes imunológicos são descritos como auxiliares para o diagnóstico de hipotireoidismo (HAINES et al., 1984; BEALE et al., 1990). A mensuração de T4 livre pode ser associada ao teste de auto-anticorpos contra tireoglobulina (TgAA). Este teste isolado não é sensível para o diagnóstico da endocrinopatia em questão (FERGUSON, 2007), mas o fato de ser incomum cães com doenças não tiroidianas, resultados positivos o tornam interessante quando os níveis de T4t e TSH não confirmam a doença (MOONEY, 2011). Estudos sugerem que cães com baixa titulação para TgAA possam na verdade não terem sido submetidos ao distúrbio imunomediado e sim à atrofia folicular idiopática, suscitando que sejam mecanismos independentes (BEIERWALTES et al., 1968). Em contrapartida, Ferguson (2007) demonstrou que, em cães, quando os níveis de TgAA estão altos (cerca de 20% dos animais), o parênquima glandular ainda não foi suficientemente destruído para que o animal manifeste sinais clínicos. Por conseguinte, este teste diagnóstico permite constantemente o resultado falso negativo, visto que sua utilização em fase de manifestação clínica possivelmente demonstra resultados abaixo da referência para a doença. Entretanto, a mensuração de TgAA em parentes de cães positivos para hipotireoidismo pode ser sugerida como um método interessante para detectar a doença em estágios precoces, embora haja descrito na literatura que cerca de 15% dos animais positivos para TgAA não desenvolvem hipotireoidismo (BEHREND 2005; HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). Não obstante, novos estudos sobre o tema são sugeridos, uma vez que não é estabelecido o tempo final de acompanhamento destes pacientes para descartar a possibilidade de progressão da endocrinopatia (BEHREND, 2005). Outra análise sugerida na literatura é a titulação de anticorpos anti-tireoperoxidase (anti-TPO). Todavia, os estudos existentes também não foram capazes de definir se esta avaliação é mesmo segura na busca pelo diagnóstico de hipotireoidismo em cães (SKOPEK et al., 2006).

2.4.3.7 Resposta terapêutica

A avaliação do paciente em terapia de reposição hormonal com T4 é um método prático para confirmar o diagnóstico de hipotireoidismo. Não obstante, não deve ser uma abordagem encorajada sem a realização dos testes hormonais. A indicação para a análise da resposta terapêutica é que esta pode ajudar a comprovar o diagnóstico ou descartá-lo. Esta metodologia consiste em iniciar a terapia com levotiroxina sódica na dose de $0,02\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (q12h *PO*). Caso a melhora clínica, especialmente comportamental ocorra, a reposição deve ser temporariamente suspensa para observação da recidiva sintomatológica. Caso isto não aconteça, doenças responsivas à terapia tireoidiana devem ser suspeitas. Além disso, se não houver resposta ao tratamento até no máximo 3 meses de reposição hormonal, a mesma deve ser suspensa e outro diagnóstico deve ser proposto (SCOTT-MONCRIEFF, 2012). É importante ressaltar que a observação da repilação não é uma avaliação fidedigna, visto que a pelagem de animais eutireoideos também responderá favoravelmente à suplementação hormonal (BEHREND, 2005). Isto posto, esta avaliação tem caráter subjetivo.

No contexto exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o *status* funcional tireoidiano comparado com parâmetros hematológicos, bioquímicos, histológicos e moleculares na pele de cães da raça golden retriever

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Apreciação Bioética

O presente trabalho foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e aprovado sob o protocolo de número 3464210316 (Anexo A).

4.2. Local

Os animais foram provenientes do atendimento clínico da Policlínica Veterinária Escola da Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, localizada em Valença/RJ e do Hospital Veterinário da UFRRJ no setor de Pequenos Animais localizado em Seropédica/RJ. Ambas as instituições autorizaram a utilização das dependências de forma documentada (Anexo B).

4.3. Animais

O uso dos animais foi consentido por seus tutores de forma documentada (Anexo C).

Foram utilizados 21 cães da raça Golden Retriever, machos, não submetidos à orquiectomia, com idade variando entre 4 e 12 anos com algum sinal clínico de hipotireoidismo.

Segundo Hegstad-Davies e colaboradores (2015), não há interferência nos exames de animais sob efeito de ectoparasiticidas, bem como fármacos preventivos de dirofilariose. Assim sendo, estes animais não foram excluídos. Em contrapartida, é importante destacar que nenhum animal vacinado há menos de 6 meses foi incluído no estudo.

4.4. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em 2 grupos experimentais: (1) Grupo controle ou eutireoideo – Compreende cães normotireoideos segundo os testes de triagem hormonal; e (2) Grupo hipotireoideo – Cães com diagnóstico de hipotireoidismo segundo os testes de triagem hormonal.

Todos os animais foram submetidos à avaliação física (escore de condição corporal, coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar, temperatura corporal, palpação abdominal e de linfonodos, definição de grau de desidratação, ausculta cardiopulmonar e frequência cardiorrespiratória); detalhamento do histórico de cada animal com anamnese abordando parâmetros como alimentação, ingestão hídrica, produção urinária e fecal; e exames laboratoriais (hemograma, dosagem de alanino-amino-transferase – ALT, aspartato aminotransferase - AST, creatinina, ureia, colesterol e triglicerídeos).

4.5 Obtenção de amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção da veia cefálica de qualquer dos membros de cada animal, no volume de 3ml e acondicionadas em frascos com anticoagulante (heparina) para que fossem obtidas as amostras de plasma para elaboração do hemograma. Em frascos simples (sem anticoagulante), foi acondicionado material para determinação de parâmetros hepáticos, lipidograma e parâmetros renais, bem como concentração hormonal.

4.6 Dosagens hormonais

Todas as dosagens hormonais foram realizadas pelo laboratório TECSA Tecnologia e Sanidade Animal®, localizado em Belo Horizonte/MG pelo método de radioimunoensaio.

4.6.1 T4 livre

A mensuração de T4 livre foi realizada pela técnica de diálise de equilíbrio e metodologia radioimunoensaio.

4.6.2 TSH

A mensuração do hormônio estimulador da tireoide endógeno foi realizada pela técnica de radioimunoensaio.

4.6.3 Teste de Estimulação com TSH

O teste de estimulação da tireoide com TSH foi realizado com duas coletas de sangue com intervalo de 8 horas, sendo a primeira coleta para aferição de T4 total basal e a segunda para a mensuração de T4 total após aplicação de TSH sintético recombinante humano (Thyrogen® Genzyme 0,9mg/ml) na dose de 150µg/animal, segundo protocolo previamente descrito por Boretti e colaboradores (2009).

4.6.4 T4 total

A mensuração da tiroxina total foi realizada pela técnica de radioimunoensaio com amostras do tempo zero (imediatamente antes da aplicação de Thyrogen®) e tempo oito de coletas sanguíneas.

4.6.5 Análise hematológica e bioquímica

As amostras foram coletadas de veias cefálicas no volume aproximado de 1ml em tudo contendo o anticoagulante EDTA para exame hematológico e cerca de 2ml em tubos simples (sem anticoagulante) para análises bioquímicas realizadas no Laboratório de Biofísica do Prédio de Química da UFRRJ.

A realização do exame hematológico consistiu de 3 etapas principais: (1) Hematimetria: hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de hemácias, permitindo a determinação dos índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM); (2) Leucometria: Contagem total de leucócitos e leucometria específica; (3) Plaquetometria.

Para as etapas de hematimetria, leucometria global e plaquetometria, foi utilizado o equipamento pocH 100iV Diff® da Sysmex. A leucometria específica foi realizada em

esfregação de sangue periférico observado em microscopia óptica em tamanho de 1000x (objetiva de 100x).

A mensuração de ALT, AST, colesterol, triglicerídeos, creatinina e ureia foi realizada através do analisador bioquímico automatizado A15 (Biosystems®) e os kits de reagentes foram todos da mesma marca.

Para a avaliação da atividade enzimática de ALT 25µL de amostra foram adicionados a 300µL de reagente (Tris 150mmol.L⁻¹, L-alanina 750mmol.L⁻¹, desidrogenase láctica > 1350U.L⁻¹, pH 7,3, NADH 1,3mmol.L⁻¹, 2-oxoglutarato 75mmol.L⁻¹, hidróxido de sódio 148mmol.L⁻¹, azida sódica 9.5g.L⁻¹). O produto formado foi determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 340nm, expressos em U.L⁻¹ (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1987; APPROVED RECOMMENDATION, 1985; GELLA et al., 1985).

Para a avaliação da atividade enzimática da AST, 25µL de amostra foram adicionados a 300µL de reagente (Tris 121mmol.L⁻¹, L-aspartato 362mmol.L⁻¹, desidrogenase málica > 460U.L⁻¹, desidrogenase láctica > 660 U.L⁻¹, pH 7,8, NADH 1.3mmol.L⁻¹, 2-oxoglutarato 75mmol.L⁻¹, hidróxido de sódio 255mmol.L⁻¹, azida sódica 9.5g.L⁻¹). Os resultados, expressos em U.L⁻¹, foram lidos em espectrofotômetro a 340nm (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, 1987; APPROVED RECOMMENDATION, 1985; GELLA et al., 1985).

Para a determinação da concentração de colesterol total, 4 µL de amostra foram adicionados a 300µL de reagente de cor (Pipes 35mmol.L⁻¹, colato de sódio 0,5mmol.L⁻¹, fenol 28mmol.L⁻¹, colesterol esterase > 0,2U.mL⁻¹, colesterol oxidase > 0,1U.mL⁻¹, peroxidase > 0,8U.mL⁻¹, 4-aminoantipirina 0,5mmol.L⁻¹, pH 7,0). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 505nm, e os resultados expressos em g.L⁻¹ (ALLAIN et al., 1974; MEIATTINI et al., 1978).

Para a determinação da concentração de triglicerídeos, 3µL de amostra foram adicionados a 300µL de reagente de cor (Pipes 45 mmol.L⁻¹, 4-clorofenol 6mmol.L⁻¹, cloreto magnésio 5mmol.L⁻¹, lipase > 100U.mL⁻¹, glicerol quinase > 1,5U.mL⁻¹, glicerol-3-fosfato oxidase > 4U.mL⁻¹, peroxidase > 0,8U.mL⁻¹, 4-aminoantipirina 0,75mmol.L⁻¹, ATP 0,9mmol.L⁻¹, pH 7,0). O padrão usado foi Glicerol equivalente a trioleína 200mg.dL⁻¹ (2,26mmol.L⁻¹), na concentração de 50g.L⁻¹. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 500nm, e os resultados expressos em g.L⁻¹ (BUCOLO; DAVID, 1973; FOSSATI; PRENCIPE, 1982).

Para a determinação da concentração de creatinina, 4µL de amostra foram adicionados a 300µL de reagente de cor (Hidróxido de sódio 0,4mol/L, detergente e Ácido pícrico 25mmol.L⁻¹). O padrão usado foi na concentração de 50g.L⁻¹. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 505nm, e os resultados expressos em µmol.L⁻¹ (WEBER; VAN ZANTEN, 1991; PEAKE; WHITING, 2006).

Para a determinação da concentração de ureia, 3µL de amostra foram adicionados a 300µL de reagente de cor (Tris 100mmol.L⁻¹, 2-oxoglutarato 5,6mmol.L⁻¹, urease > 140U.mL⁻¹, glutamato desidrogenase > 140U.mL⁻¹, etilenglicol 220g.L⁻¹, azida sódica 0,95g.L⁻¹, pH 8,0 e NADH 1,5mmol.L⁻¹, azida sódica 9,5g.L⁻¹). O padrão usado estava na concentração de 50g.L⁻¹. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540nm, e os resultados expressos em g.L⁻¹ (TALKE; SCHUBERT, 1965; GUTMANN; BERGMAYER, 1974).

4.7 Biópsia cutânea

As biópsias cutâneas de cada animal foram realizadas na região dorso lombar no total de 3 fragmentos por animal e obedeceram ao seguinte protocolo: anestesia subcutânea com

cloridrato de lidocaína 1% na dose de 0,7mg/kg; incisão com *punch* 0,7mm; sustentação do fragmento cutâneo com pinça anatômica para corte da base do fragmento com tesoura cirúrgica; sutura descontínua simples com fio nylon 3-0. Os procedimentos sequenciais foram dependentes do destino de cada amostra cutânea: (1) manutenção do fragmento embebido em formalina 10% em superfície lisa não absorvente por 10 minutos com posterior acondicionamento em frasco plástico contendo também formalina 10% no volume equivalente a cerca de 15 vezes o volume do fragmento. Este material foi submetido aos procedimentos sequenciais para análise histopatológica no Laboratório de Anatomia Patológica e Histopatologia do PSA/UFRRJ; (2) imediato acondicionamento do fragmento em tubos do tipo *Ependorfs* que foram transportados em recipiente contendo nitrogênio líquido para acondicionamento em *freezer* de -80°C até a execução da técnica de PCR em tempo real para expressão da desidases tipo 2 e receptor de HT do tipo Tr β no Laboratório de Biologia Molecular do DCF/UFRRJ.

4.8 Técnica de Reação de Cadeia de Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*) em tempo real (qRT-PCR)

Aos fragmentos congelados em freezer -80°C foram adicionados 750 μ L de Trizol® e, posteriormente, foram submetidos à maceração no aparelho Tissue Lyser LT® (Qiagen) para ruptura e homogeneização no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Foi adicionado de clorofórmio P.A. (100%); os tubos foram agitados por inversão por 15 segundos e, em seguida, incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram submetidos à centrifugação refrigerada a 4°C (14000RPM por 15 minutos), dando origem a três fases: superior contendo RNA, intermediária contendo DNA e inferior contendo proteínas e possíveis contaminantes.

A porção de RNA de cada amostra foi transferida para outros tubos (1,5ml) previamente identificados nos quais foram adicionados 10 μ L de solução de glicogênio (20mg/ml). Em seguida, foi adicionado 0,5ml de isopropanol P.A. (100%) gelado para cada ml de Trizol®. Procedeu-se com agitação por inversão seguida de incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram levados à centrífuga refrigerada a 4°C (14000RPM por 15 minutos), propiciando a formação do *pellet* de RNA. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi, então, lavado com etanol 75%. Em sequência, os tubos foram levados à centrífuga refrigerada a 4°C (14000RPM por 15 minutos) e, em seguida, os *pellets* foram reservados em tubo aberto para secarem por cerca de 90 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os *pellets* foram ressuspensos em 12 μ L de água RNase *free* seguido de homogeneização com pipeta. O passo seguinte foi a incubação em banho seco a 60°C por 10 minutos. E, seguida, as amostras foram tratadas com DNase segundo o protocolo da Doxyribonuclase I, Amplification Grade ® Invitrogen na proporção de 1 μ l de RNA : 1 μ l de tampão : 1 μ l de DNase, perfazendo 10 μ l de volume final. Posteriormente, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período de tempo, a reação foi inativada pela adição de 1 μ l de solução de EDTA 25mM. Na sequência, os tubos foram aquecidos a 65°C por 10 minutos.

O RNA das amostras foi dosado no espectrofotômetro tipo nanodrop. Em seguida, foi preparado o *mix* contendo tampão RT 10x, *Ramdon primers* e *mix* de DNTP. Este *produto* foi levado ao termociclador para o preparo da fita complementar de DNA (cDNA). Os primers foram então testados pela curva de melt. Na sequência, foram pipetados na placa de leitura 2 μ l de amostra e 8 μ l dos respectivos *mix* nos poços em triplicata. A placa foi, então, selada,

colocada no aparelho de *spin* e, em seguida, levada à máquina de PCR em tempo real (QuantStudio 3) programado para reação de 10µl e calibrado para ensaio de Sybr Green®.

O gene de referência utilizado foi GAPDH. Todos os procedimentos após a extração do material foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do DCF/UFRRJ.

4.9 Histopatologia

Os fragmentos foram desidratados em álcool, tratados com xilol, embebidos e incluídos em blocos de parafina. Em seguida, foram cortados em 5µm e corados em lâminas de microscopia óptica com hematoxilina-eosina (HE).

4.10 Avaliação dos sinais clínicos

O escore de condição corporal foi obtido pelo método semi-quantitativo descrito por Laflamme (1997).

Características relacionadas ao comportamento individual foram avaliadas durante à anamnese. Nesta, os tutores relataram se houve alteração comportamental como fadiga, apatia, sonolência e termofilia. Este último parâmetro foi avaliado de forma subjetiva pelo tutor de acordo com possíveis mudanças nos hábitos de deitar como animais que passaram a evitar locais ventilados e com pisos frios, bem como procuraram mais áreas cobertas, camas e/ou aumentaram o tempo de exposição solar. Nos quesitos relacionados à disposição do animal, o tutor foi orientado a descartar mudanças induzidas como aumento do sedentarismo ou redução do espaço físico ou do tempo acompanhado do animal. Outro dado importante avaliado foi a mudança de temperamento, com especial atenção àqueles que se tornaram agressivos, independente da intensidade. Além disso, histórico de convulsões e doenças prévias ou concomitantes também foram catalogados para completa análise clínica de cada animal.

4.11 Concentração de Iodo na dieta

A concentração de iodo na dieta foi avaliada com análise da composição básica da ração comercial oferecida para cada animal estudado contida no rótulo. Foram desconsiderados alimentos caseiros fornecidos, bem como petiscos industrializados.

O cálculo da ingestão diária de iodo foi realizado a partir da ingestão média de 300g de ração seca por dia.

4.12 Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism (versão 7.0 para Windows - Califórnia, EUA). O intervalo de confiança adotado foi de 95% com P - valor < 0,05. Foi empregada a estatística descritiva com método numérico envolvendo apresentações de medidas de posição (média aritmética) e dispersão (desvio padrão).

Após documentar uma distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilkensen), os valores de T4 livre por diálise, TSH, T4 total pré TSH, T4 total pós TSH, GAPDH e Desiodase tipo 2 foram comparados utilizando o Teste T de *Student* não pareado.

As concentrações de iodo nas distintas dietas oferecidas aos animais deste estudo foram comparadas através da Análise da Variância de Medidas Repetidas e expressas após a correção de Bonferroni.

A hipertrofia do músculo piloerector e o escore corporal dos grupos experimentais foram comparados através do Teste Mann-Whitney-Wilcoxon. O Coeficiente de Correlação de Pearson foi utilizado de modo a medir o grau de correlação entre o T4 livre por diálise e o TSH, T4 e a idade dos animais e o TSH com a idade dos animais.

5 RESULTADOS

Os resultados foram delineados a partir da avaliação geral de 21 cães da Raça Golden Retriever, machos, não submetidos à orquiectomia, entre 4 e 12 anos de idade. Todos foram submetidos à triagem hormonal com mensuração de T4 livre por diálise e TSH. A partir destes testes hormonais, 12 animais foram selecionados para serem submetidos ao teste de estimulação com TSH e biópsia de pele para obtenção de material para análise histopatológica e de PCR para expressão de desidase do tipo 2, bem como expressão de receptores de HT do tipo TR β . Os animais selecionados compreenderam 4 cães eutireoideos escolhidos de forma aleatória dentre o total de 13 possíveis e 8 cães com diagnóstico de hipotireoidismo obtido pela associação da mensuração de T4 livre por diálise e TSH (figura 10).

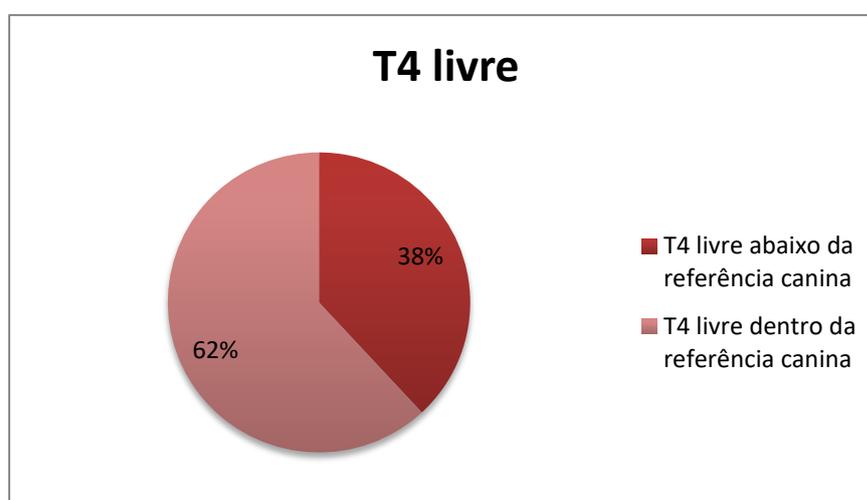


Figura 10: Distribuição dos animais em dois grupos de acordo com o resultado da mensuração de T4 livre por diálise.

5.1 Aspectos clínicos gerais

5.1.1 Idade

A faixa etária dos 21 cães estudados variou entre 4 e 12 anos (tabela 1), perfazendo a média de 7,2 anos. Cinco cães tinham 4 anos de idade (24%), quatro cães tinham 5 anos de idade (19%), dois cães tinham 6 anos de idade (9,5%), quatro cães tinham 8 anos de idade (19%), dois cães tinham 10 anos de idade (9,5%), quatro cães tinham 12 anos de idade (19%).

Tabela 2: Idade dos animais incluídos no estudo e número de animais por idade

Idade (anos)	4	5	6	8	10	12
Nº de animais	5	4	2	4	2	4

Com os resultados de T4 livre por diálise associados aos resultados de TSH, foi possível distribuir os animais em dois grupos experimentais: (1) Eutireoideos, no qual foram incluídos 13 animais. Deste grupo, 4 cães com o maior resultado de TSH foram submetidos

posteriormente ao teste de estimulação com TSH; (2) Hipotireoideos – este grupo compreendeu 8 animais com T4 livre por diálise abaixo da referência normal para a espécie, com ou não TSH acima da referência canina.

Após a construção de dois grupos experimentais, pode-se perceber que a média de idade dos cães hipotireoideos foi menor que a média dos eutireoideos, embora não haja diferença estatística entre os grupos. Os cães com hipotireoidismo obtiveram média de 6 anos de idade e a média do outro grupo foi de 8 anos de idade (figura 11).

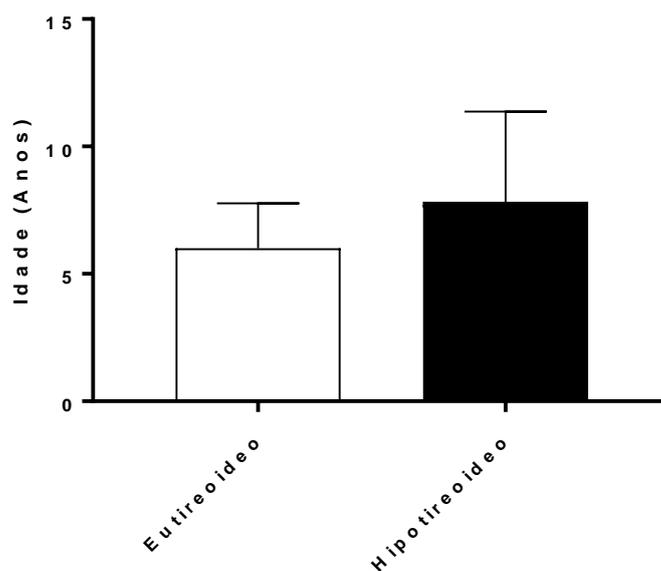


Figura 11. Idade média dos animais em anos de acordo com cada grupo definido. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($p=0,9277$).

5.1.2 Avaliação dos sinais clínicos

Com relação aos sinais clínicos, são descritos na tabela 3 alguns aspectos inespecíficos observados nos 21 animais capazes de suscitar a suspeita de hipotireoidismo, motivo pelo qual foram incluídos no estudo.

O escore de condição corporal foi aplicado de acordo com os critérios de Laflamme (1997) na escala de 1 a 9 (Anexo D). Desta forma, nenhum animal foi caracterizado como subnutrido; cinco (24%) estavam com escore de condição corporal 5; dez foram classificados como 7 (48%); e seis foram definidos como 9 (28,%). A distribuição entre grupos é descrita na figura 12.

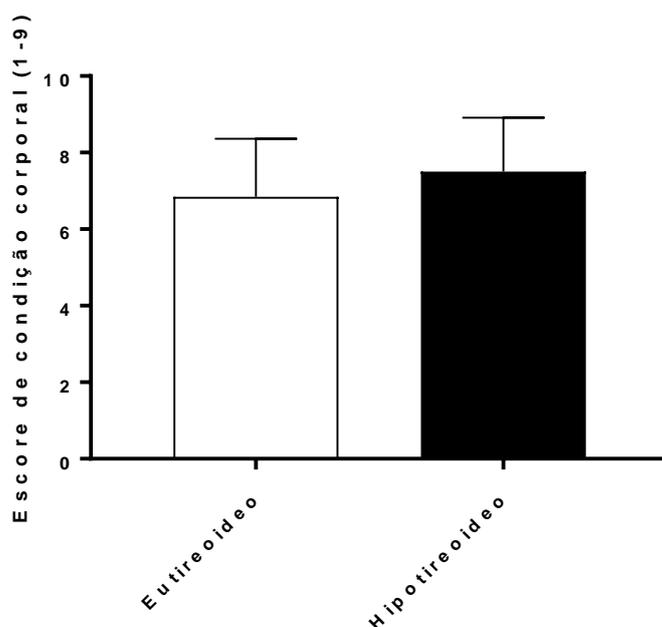


Figura 12. Escore de condição corporal. A primeira coluna representa os dados correspondentes ao grupo eutireoideo; e a segunda coluna refere-se aos cães diagnosticados com hipotireoidismo. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($p=0,3616$)

Dos 21 animais, dez (48%) foram referidos com fadiga por parte dos tutores. Os demais não apresentaram modificação neste aspecto segundo seus responsáveis.

Das dermatopatias frequentemente associadas ao hipotireoidismo, algumas foram diagnosticadas previamente aos exames e/ou relatadas pelos tutores (Anexo E). Dentre elas, apenas dois cães (9%) apresentaram leucotriquia precoce; três animais (14%) apresentaram seborreia; um animal (4%) apresentou *facies tragica*, oito (38%) foram diagnosticados com piodermite; dois apresentaram mucinose (9%); e um cão apresentou mastocitoma cutâneo (4%). Do total de animais, apenas três (14%) não apresentavam nenhuma alteração cutânea.

A agressividade foi incluída neste estudo como um parâmetro associado a neuropatias e foi descrita em apenas três cães (14%) e outro animal foi diagnosticado com convulsões (5%). Os demais não foram relatados e/ou diagnosticados com nenhuma neuropatia (81%).

5.2 Concentração de iodo na dieta

Todos os animais estudados eram alimentados, basicamente, com dieta comercial. Dentre elas, 12 (57%) eram rações classificadas como super *premium* e 9 (43%) *premium*.

A concentração de iodo nas rações utilizadas variou de 0,83 a 3,0mg (Anexo F), equivalendo ao consumo de 249 a 900 μ g iodo/dia.

Dessa forma, foi possível distribuir as rações em três grandes grupos de acordo com a concentração de iodo contida na recomendação de ingestão diária da ração (figura 13). A dieta 1 correspondeu ao grupo no qual as rações variaram de 0,83 a 1,28mg de iodo; a dieta 2 variou entre 1,6 a 2,2mg de iodo; e a dieta 3 inclui rações que continham 2,7 a 3mg de iodo.

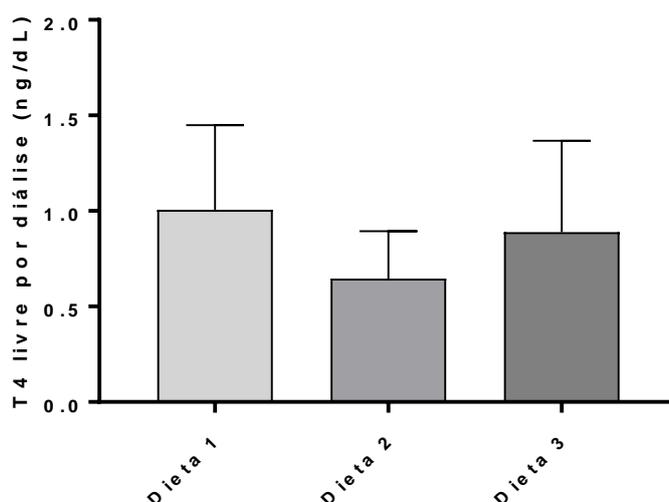


Figura 13. Nível médio de T4 livre X concentração de iodo na dieta. Valores expressos em média \pm desvio padrão (p=N.S).

5.2 Análise hematológica e bioquímica

Os exames laboratoriais inespecíficos foram realizados nos 12 cães selecionados para a segunda fase do estudo. Os exames executados foram: hemograma, ALT, AST, creatinina, ureia, colesterol e triglicerídeos.

Nenhum animal apresentou variações esperadas para cães com hipotireoidismo, como anemia normocítica normocrômica. Dentre as discretas alterações observadas, a mais comum foi monocitopenia e as demais podem ser observadas na tabela apresentada no (Anexo G).

A hipercolesterolemia foi constatada em três cães (25%); apenas um animal (8%) apresentou trigliceridemia; e outro (8%) estava com a concentração sérica de ureia aumentada. Os demais parâmetros bioquímicos analisados estavam dentro dos níveis de referência para a espécie.

5.3 Dosagens hormonais

Todos os 21 animais estudados apresentavam suspeita de hipotireoidismo por algum dos critérios de inclusão, sejam eles clínicos ou laboratoriais. Os critérios de exclusão compreenderam animais sob uso de algum fármaco ou doença pregressa diagnosticada em curso. Além disso, apenas cães com resultados de TSH a partir de 0,15ng/mL (tabela 3) foram selecionados para a segunda fase do estudo.

Tabela 3: Resultados de dosagens de TSH utilizados como critérios de exclusão para a segunda fase do estudo.

Animais	13	14	15	16	17	18	19	20	21
TSH (ng/mL)	0,12	0,04	0,15	0,15	0,12	0,08	0,09	0,10	0,04

Aqueles animais cujos resultados da mensuração de TSH mantiveram-nos no estudo, obtiveram valores entre 0,15 e 0,58ng/mL discriminados na tabela 4. Estes mesmos valores foram utilizados para apresentar a figura 14 que compara as médias das concentrações plasmáticas deste hormônio entre os grupos estabelecidos.

Tabela 4: Resultados de dosagens de TSH dos 12 animais selecionados para a segunda fase do estudo.

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TSH (ng/mL)	0,22	0,58	0,33	0,28	0,46	0,21	0,29	0,15	0,21	0,19	0,17	0,20

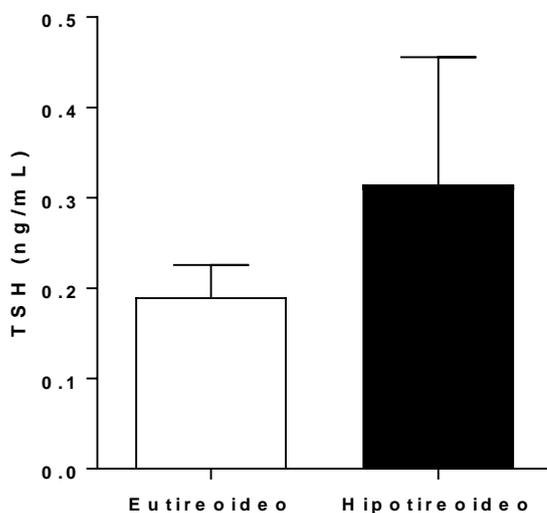


Figura 14: Gráfico da mensuração de TSH em ng/mL. Na primeira barra são representados os valores de TSH do grupo eutireoideo; na segunda barra, os valores do mesmo hormônio do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($p=0,0455$).

A mensuração de T4 livre por diálise resultou em dados (tabela 5) capazes de permitir a distribuição dos animais em dois grupos: (1) Controle ou eutireoideo: valores dentro da normalidade para a espécie segundo o valor de referência laboratorial; e (2) Hipotireoideo: valores abaixo do limite mínimo para cães de acordo com o laboratório. É importante ressaltar que os dados aqui relacionados excluem os valores de T4 livre por diálise obtidos a partir da mensuração dos 9 animais excluídos da segunda fase do estudo. Estes dados, por sua vez, são apresentados na tabela 6.

Tabela 5: Resultado de T4 livre por diálise (T4I/d) obtidos a partir da mensuração nos 12 animais selecionados para a segunda fase do estudo

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T4I/d (0,6 -3,5ng/dL)	0,68	0,6	0,49	0,57	0,48	0,52	0,46	0,7	1,07	1,63	0,44	0,57

Tabela 6: Resultado de T4 livre por diálise (T4l/d) obtidos a partir da mensuração nos 9 animais excluídos da segunda fase do estudo

Animais	13	14	15	16	17	18	19	20	21
T4l/d (0,6 -3,5ng/dL)	1,10	1,20	1,19	1,02	0,90	1,33	1,01	1,03	0,90

Os resultados da mensuração de T4 livre por diálise são, ainda, apresentados de forma comparativa entre os grupos como na figura 15 exibida a seguir:

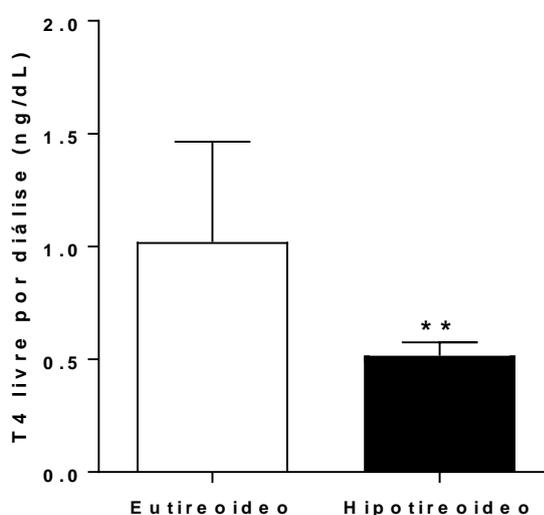


Figura 15: Gráfico da mensuração de T4 livre por diálise (T4ld) em ng/dL. Na primeira barra são representados os valores de T4ld do grupo eutireoideo; na segunda barra, os valores do mesmo hormônio do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($p=0,023$).

A dosagem de T4 total antes e após a estimulação com rhTSH é descrita na tabela 7. É importante analisar os gráficos apresentados na figura 16 que demonstram as comparações entre os grupos. É importante perceber que não houve diferença significativa na dosagem de T4 total basal entre os grupos experimentais.

Tabela 7: Dosagem de T4 total basal e após estimulação com TSH

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
T4t basal		1,8			1,69	1,38	1,29	1,16	2,35	1,22	2,61	3,02	1,81	1,18	1,9
T4t pós TSH		3,94			4,31	4,55	3,2	2,79	5,6	4,0	6,39	5,85	3,63	4,09	3,81

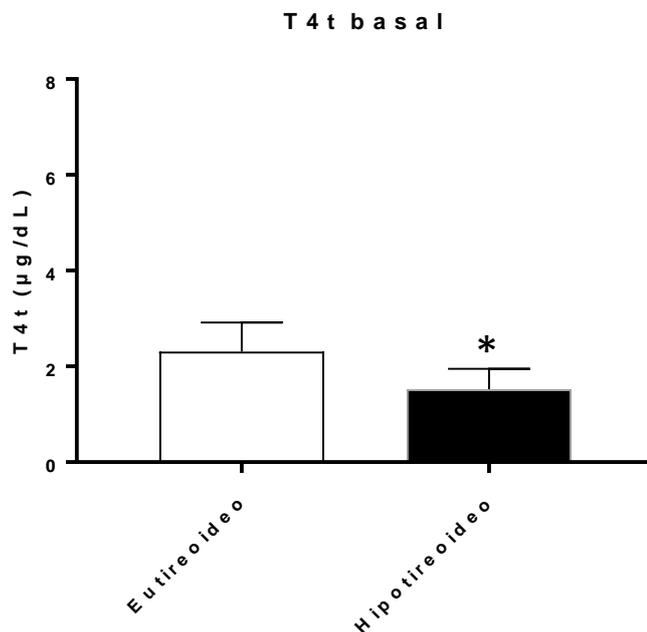


Figura 16: Gráfico da mensuração de T4 total basal. Na primeira coluna são representados os valores de T4t do grupo eutireoideo; na segunda coluna, os valores do mesmo hormônio do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média ± desvio padrão ($p=0,0246$).

Além desta comparação, a seguir (figura 17) são observados a média de T4 total de cada grupo após estimulação com rhTSH. É possível perceber que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

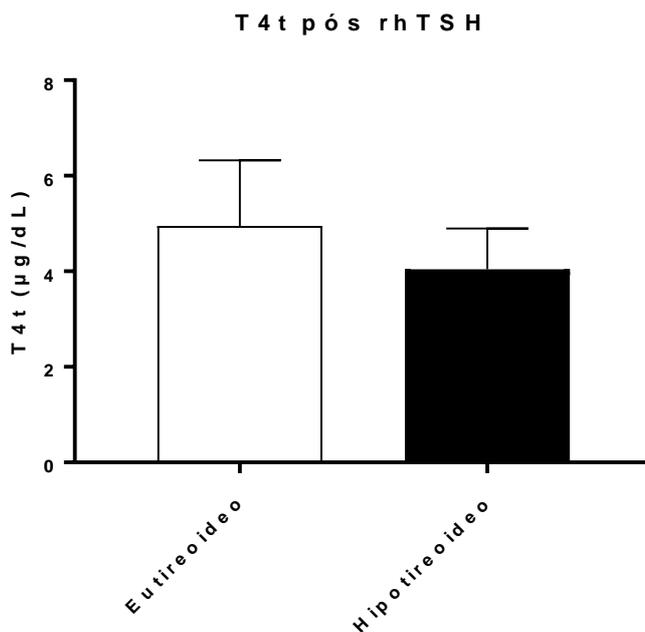


Figura 17: Gráfico da mensuração de T4 total após estimulação com rhTSH. Na primeira coluna são representados os valores de T4t do grupo eutireoideo; na segunda coluna, os valores do mesmo hormônio do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média ± desvio padrão ($p=0,1826$).

O resultado do teste de estimulação com TSH é apresentado a seguir. São exibidos dois gráficos (figuras 18 e 19) nos quais o primeiro representa o teste realizado no grupo de animais eutireoideos e o segundo, o mesmo teste realizado no grupo hipotireoideo. É interessante observar que em ambos os grupos houve diferença estatística quando comparadas as mensurações de T4 total pré e pós-TSH, sendo $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente.

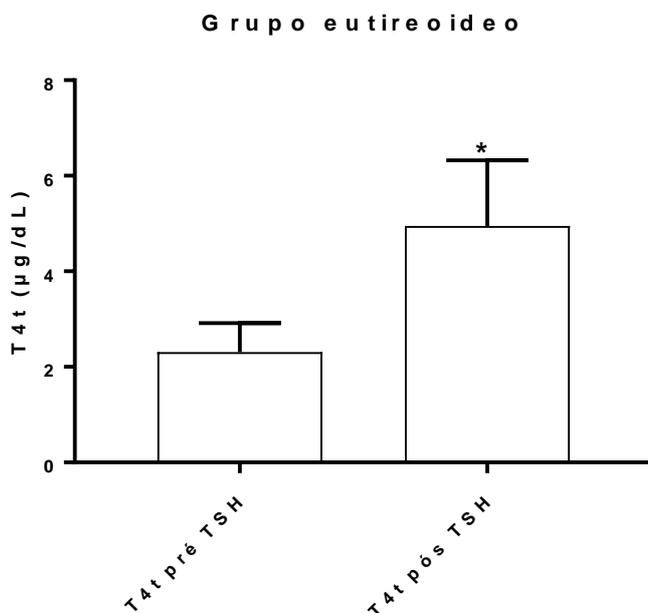


Figura 18: Gráfico representando o teste de estimulação com rhTSH realizado no grupo eutireoideo. Na primeira coluna é representada a média dos valores de T4t basal; na segunda coluna, a média dos valores após estimulação com TSH. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($p < 0,05$).

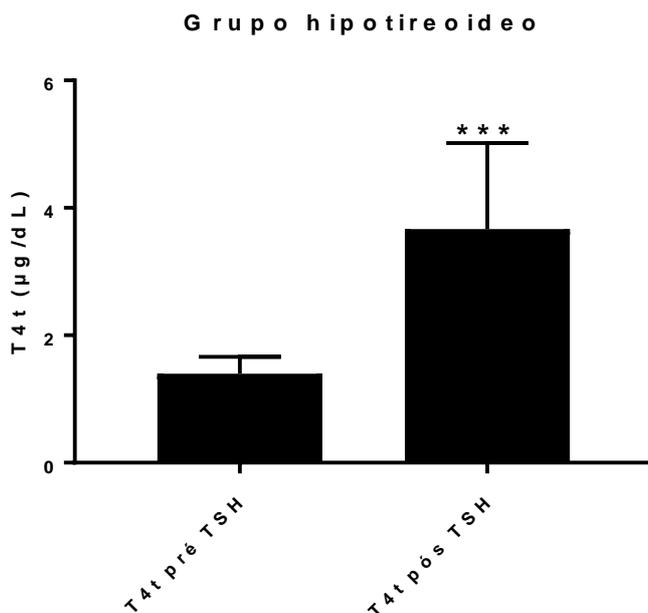


Figura 19: Gráfico representando o teste de estimulação com rhTSH realizado no grupo hipotireoideo. Na primeira coluna é representada a média dos valores de T4t basal; na segunda coluna, a média dos valores após estimulação com TSH. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($p < 0,001$).

5.4 Análise molecular - qRT-PCR

A análise molecular pelo método de PCR em tempo real foi realizada tendo como gene de referência o GAPDH. A figura a seguir exibe o resultado comparativo da média da expressão deste gene na pele dos 12 animais estudados distribuídos em dois grupos (figura 20). Não houve variação estatística entre os grupos experimentais.

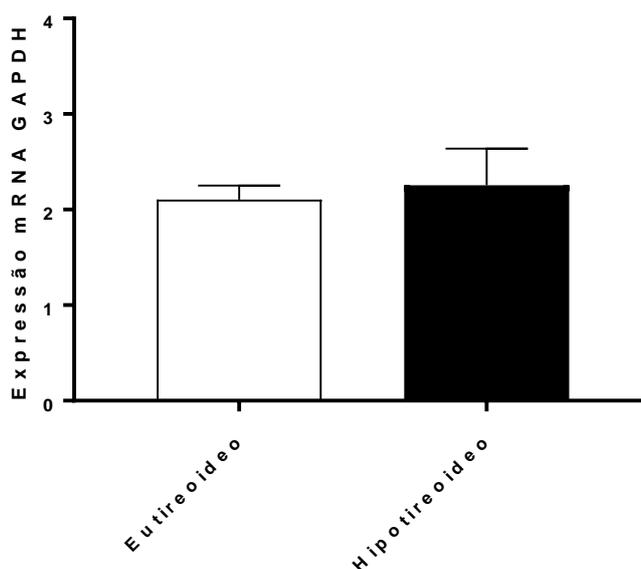


Figura 20: Expressão de mRNA GAPDH. Gráfico exibindo a ausência de diferença significativa entre os grupos. Na primeira coluna é representada a média dos valores de GAPDH do grupo eutireoideo; na segunda coluna, a média dos valores de GAPDH do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($p=0,2652$).

A análise da expressão de mRNA da desidase do tipo 2 na pele dos 12 animais incluídos na segunda fase gerou o gráfico a seguir (figura 21). Neste, pode ser observada a ausência de variação significativa entre os grupos.

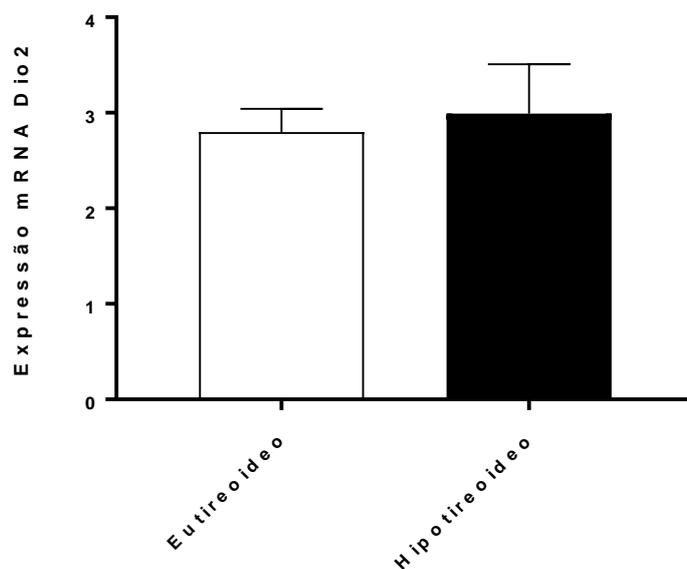


Figura 21. Expressão de mRNA Desiodase tipo 2. Gráfico exibindo a ausência de diferença significativa entre os grupos. Na primeira coluna é representada a média dos valores de D2 do grupo eutireoideo; na segunda coluna, a média dos valores de D2 do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($p=0,3911$).

A análise da expressão de mRNA do receptor de hormônios tireoidianos do tipo $Tr\beta$ na pele dos 12 cães estudados gerou o gráfico a seguir (figura 21). Neste, pode ser observada a ausência de variação significativa entre os grupos.

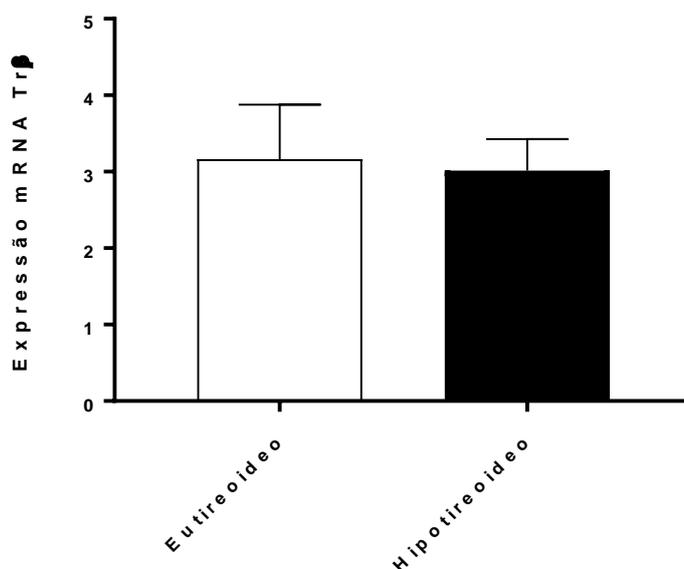


Figura 21. Expressão de mRNA $Tr\beta$. Gráfico exibindo a ausência de diferença significativa entre os grupos. Na primeira coluna é representada a média dos valores de $Tr\beta$ do grupo eutireoideo; na segunda coluna, a média dos valores de $Tr\beta$ do grupo hipotireoideo. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($p=N.S$).

5.5 Aspectos histopatológicos

5.5.1 Epiderme

A atrofia epidérmica foi constatada em 100% dos 12 animais avaliados (figura 22). Apenas uma amostra (8%) apresentou espongiose, assim como apenas outra amostra (8%) apresentou hiperpigmentação. Com relação à hiperqueratose superficial, nenhuma leitura histológica revelou este parâmetro nem com características de ortoqueratose ou de paraqueratose, e apenas três animais obtiveram resultados compatíveis com hiperqueratose folicular (25%). Não houve resultados positivos para acantose, exocitose, hipergranulose ou epidermite (Anexo H).

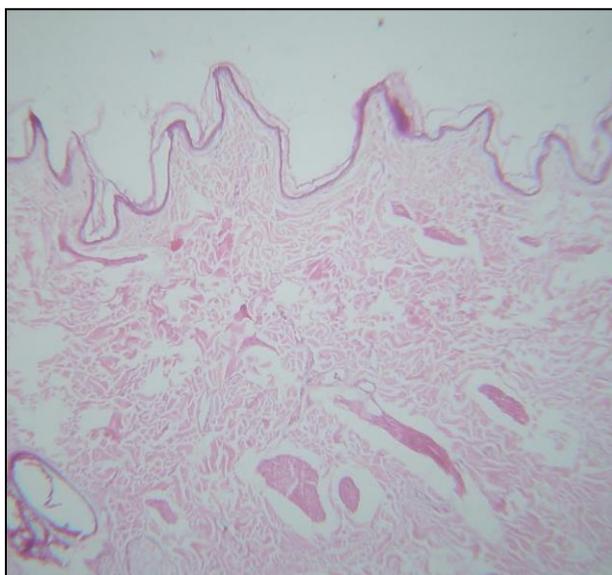


Figura 22. Fotomicrografia de epiderme. Verifica-se atrofia superficial. HE, Obj. 10X.

5.5.2 Derme

Alguns parâmetros dérmicos estavam presentes em 100% das amostras. São eles: mixedema, vacuolização do músculo piloerector e hipertrofia do mesmo (figura 23), sendo este dado considerado leve em 50% das amostras e moderado nos outros 50%. A atrofia dérmica não foi constatada em nenhuma amostra, bem como a incontinência pigmentar e sinais inflamatórios. Com relação à análise histológica das glândulas sudoríparas, 10 amostras (83%) encontravam-se em ectasia e as duas outras (16%) estavam normais; as glândulas sebáceas foram todas (100%) descritas sem alterações (figura 23). A fase folicular predominante em nove amostras (75%) foi a telogênica, enquanto duas amostras (16%) tiveram predomínio da fase anagênica e apenas uma foi classificada como predominantemente catagênica (8%). Folículos pilosos em fase kenógena acompanharam principalmente as dermes com predomínio telogênico (figura 24). A caracterização de folículos em chama (figura 25) foi observada em oito amostras (67%) (Anexo I).

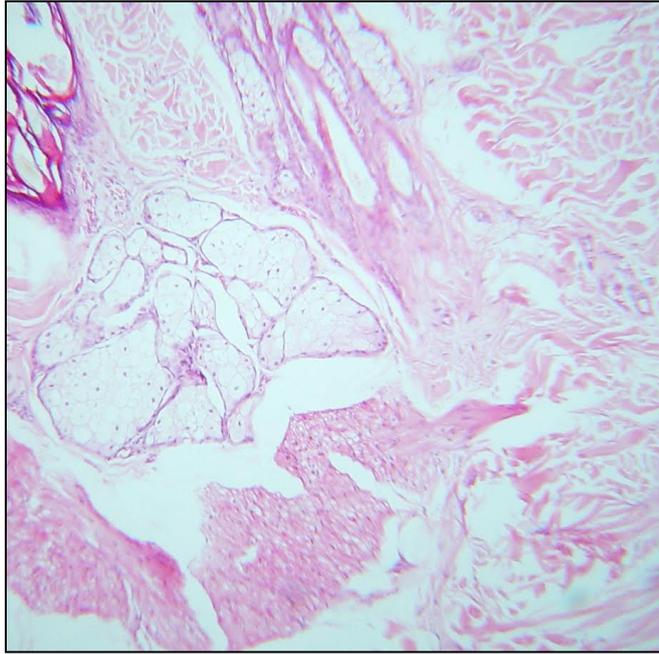


Figura 23. Fotomicrografia. Em derme, glândulas sebáceas sem particularidades, esparsamento das fibras colágenas e moderada vacuolização e hipertrofia de músculo piloerector. HE, Obj. 25X.

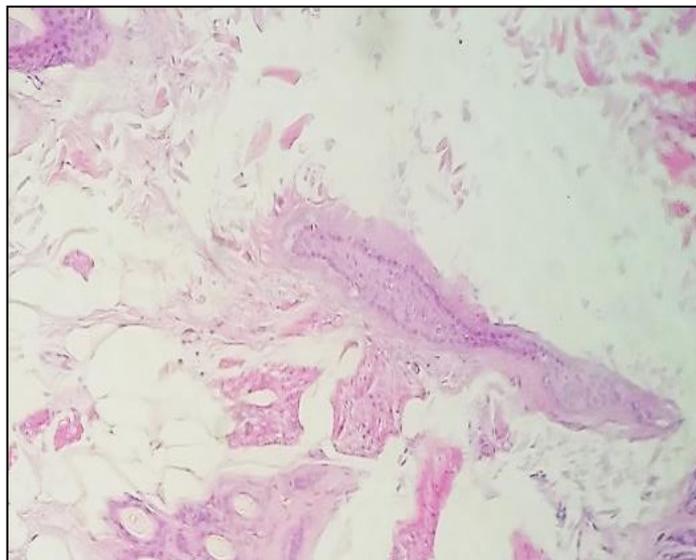


Figura 24. Fotomicrografia. Em derme, verifica-se folículo piloso em fase kenógena. HE, 16x.

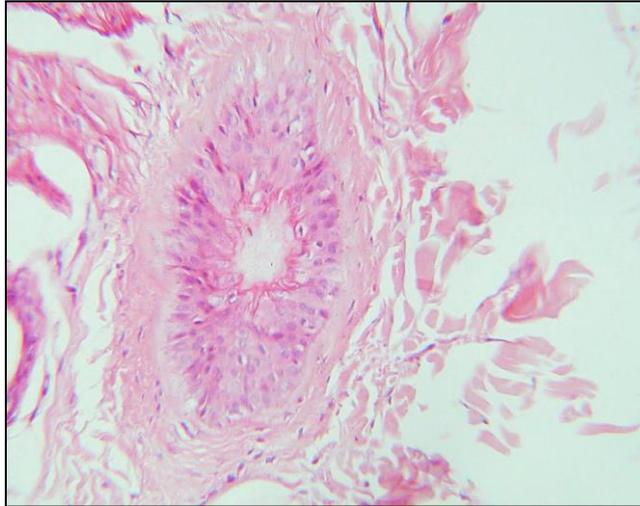


Figura 25. Fotomicrografia. Em derme, verificam-se folículos pilosos em fase telógena, exibindo queratinização tricolemal – Folículo em “chama”. HE, 25x

6 DISCUSSÃO

O desafio que ainda representa o diagnóstico de hipotireoidismo em cães foi o motivo pelo qual esta endocrinopatia nos despertou interesse para a elaboração deste estudo. A possibilidade de encontrar respostas para dúvidas clínicas no processo fisiopatológico em níveis moleculares vem encantando pesquisadores na área e tornando possível rebuscar a conduta médico-veterinária aplicada. Em contrapartida, é sabido que, em ensaios clínicos, encontram-se inúmeros fatores variáveis que podem interferir nos resultados e conclusões (CREDILE et al., 2011). A partir desta premissa, optou-se por analisar os parâmetros deste trabalho em cães de uma única raça, sendo escolhida a Golden Retriever por esta estar entre as mais citadas raças predispostas ao hipotireoidismo, a fim de minimizar as variantes inter-raciais (WALTON et al., 2001; FERGUSON, 2007; HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). Outrossim, é indiscutível a influência de hormônios sexuais no que tange o *status* tireóideo de qualquer organismo, especialmente em fêmeas (PANCIERA et al., 2012; THURÓCZY et al., 2016.). Dessa forma, foram excluídas fêmeas independente da fase do ciclo estral. Também são ditos como possivelmente predispostos animais submetidos à gonadectomia, tanto machos como fêmeas (DIXON et al., 1999). Este fator deve ser avaliado com cautela visto que a propensão é que, com o passar dos anos, a maioria dos animais seja esterilizado. E, como animais com idade avançada podem sofrer de hipotireoidismo mais facilmente, esta pode ser uma estatística tendenciosa. Outro fator importante é a possibilidade da tireoidite autoimune ser induzida por distúrbios imunológicos sistêmicos de origem natural ou estimulações adquiridas artificiais, como a vacinação (FERGUSON, 2007). Por este motivo, cães vacinados há menos de seis meses da coleta de material não foram incluídos no estudo.

6.1 Aspectos clínicos

A faixa etária dos cães estudados corrobora dados da literatura. Segundo fontes publicadas, os casos de hipotireoidismo em cães se concentram entre seis e dez anos de idade (SCOTT et al., 2001; GROSS et al., 2005). Não obstante, alguns autores relataram a queda fisiológica dos níveis séricos de T4 em cães a partir de seis anos (REIMERS et al., 1990), embora as razões para esta redução ainda sejam especulações. São apontadas possíveis associações com doenças não tireoidianas, redução da responsividade da tireoide ao TSH ou, ainda, fibrose, atrofia idiopática e alterações degenerativas da glândula (SCOTT-MONCRIEFF, 2012). Ainda assim, esta variação gira apenas em torno de 1%, segundo Hegstad-Davies e colaboradores (2015). Estes autores acreditam que o efeito da idade pode diminuir a responsividade à retroalimentação do eixo HHT, bem como o mesmo pode ocorrer em possíveis doenças não tireoidianas ou hipotireoidismo subclínico. De qualquer forma, este paradigma não foi observado em nosso estudo. Não houve correspondência entre o avanço da idade dos 21 animais e a queda nos níveis de T4. Comparativamente, o mesmo foi observado nos níveis de TSH sérico, isto é, a idade não foi um fator associado à elevação da concentração deste hormônio. É importante refletir se esta desvinculação pode ter ocorrido devido ao número total de animais estudados, o que pode ter permitido uma lacuna nesta análise. Portanto, fica claro que esta não é uma conclusão definitiva do presente estudo até que o mesmo seja reproduzido com amplificação do número de cães analisados.

É sabido que a suspeita de hipotireoidismo em cães pode acontecer por diversos indícios. As alterações compatíveis com a endocrinopatia podem surgir de forma isolada ou com combinações aleatórias (SCOTT-MONCRIEFF, 2007). Todos os animais incluídos no

estudo apresentavam pelo menos algum sinal clínico sugestivo de hipotireoidismo. Dentre eles, os distúrbios metabólicos merecem destaque. Nestes, foram incluídos a fadiga, observada em quase a metade dos animais (47%), termofilia que foi pouco relatada (25%) e a obesidade ou ganho de peso, observados em 76% do total de 21 animais. Estes últimos parâmetros foram analisados a fim de determinar associação ou não à intolerância ao exercício.

De fato, o ganho de peso é um problema crescente em cães, especialmente no que se refere aos hábitos modernos de reduzida atividade física e maior motivação alimentar (CORBEE, 2012). A literatura norteia, ainda, sobre o aumento da obesidade em crianças e animais de companhia criados por responsáveis que não praticam exercícios físicos, bem como fazem uso de alimentos práticos industrializados e hipercalóricos (GERMAN, 2015). Todavia, embora neste estudo 76% dos animais estivessem acima do escore corporal ideal, apenas 43% destes foram relatados como sedentários. Sem dúvida, é importante refletir sobre a possibilidade de omissão de hábitos alimentares indesejados por parte dos tutores, como fácil acesso a alimentos altamente calóricos. Todavia, independente deste fato, estudos recentes (MAO et al., 2013) incluem o Golden Retriever como raça predisposta à obesidade independente de sua origem. Outrossim, pesquisadores da Universidade de Cambridge (RAFFAN et al., 2016; DAVISON, L. J. et al., 2017) vêm estudando a associação genética com a obesidade em cães. Particularmente, em Labradores Retrievers foi descoberta a depleção de um gene da POMC capaz de alterar o apetite e influenciar no balanço energético destes animais. Dada a proximidade genética entre as raças do grupo Retriever, não é elucubração extrapolar estes dados e sugerir que os Goldens Retrievers possam sofrer da mesma afecção ou algo semelhante ao relatado em Labradores. De qualquer forma, novos estudos nesta linha de pesquisa precisam ser publicados para aprofundar esta análise.

Outros sinais clínicos comumente observados nos animais estudados foram as dermatopatias. Sabe-se que os hormônios tireoidianos são fundamentais para a manutenção da saúde tegumentar. Assim sendo, a redução da concentração deste hormônio, reflete em sinais clínicos importantes. Independente da etiologia, a pele é o órgão que, em muitos casos, manifesta as alterações mais precocemente observadas por parte dos tutores e podem ser relacionadas com o hipotireoidismo tanto em cães, como em humanos (BURMAN; MCKINLEY-GRANT, 2006; SAFER 2011). Por outro lado, não se pode negligenciar o fato de que, como a pele permite visualização de sua afecção por parte dos responsáveis, esta relação entre hipotireoidismo e dermatopatias pode não ser tão expressiva e apenas significar que o incômodo visual e, por vezes, olfativo relacionado a distúrbios tegumentares faz com que os tutores busquem avaliação profissional muito mais frequentemente do que por afecções silenciosas como cardiopatias ou dislipidemias, por exemplo. Muito embora não se discuta a ação direta dos hormônios tireoidianos na pele, os sinais dermatológicos frequentemente observados não são necessariamente devidos ao distúrbio tireóideo. Estudos mostram que a relação entre hipotireoidismo e dermatopatias não é estrita (SAFER, 2013). Não se pode esquecer que os hormônios tireoidianos aumentam a atividade celular e consequentemente colaboram para a melhora do tecido cutâneo como um todo (BURMAN; MCKINLEY-GRANT, 2006). Além disso, este aumento também favorece o curso do ciclo de vida dos pelos, contribuindo para que a fase telógena e kenógena não perdurem (DIXON et al., 1999; MÜNTENER et al., 2012). Dessa forma, o estímulo para a ativação da fase anagênica beneficia a troca da pelagem por uma mais nova, mais brilhosa e menos quebradiça. Assim, tem-se pelagem geralmente opaca e falha no hipotireoidismo e recuperação com a reposição hormonal. Este fator deve ser levado em consideração quando o médico veterinário faz a avaliação clínica durante o tratamento com tiroxina. Como o paciente tende a se apresentar com pelagem de melhor qualidade, isto pode interferir no entusiasmo do tutor e cabe ao profissional avaliar outros parâmetros que possam distinguir este dado com a

real resposta positiva frente ao tratamento. Adicionalmente, outros estudiosos advogam pelo aumento da resposta imune humoral e celular frente ao estímulo de HT, o que pode repercutir na diminuição de infecções oportunistas, especialmente na pele, tão comuns em cães com suspeita de hipotireoidismo (MILLER; POPIEL; CHEŁMONSKA-SOYTA, 2015). No entanto, pouco se pode afirmar sobre a relação direta entre sinal clínico e a melhora associada à reposição hormonal neste caso.

6.2 Concentração de Iodo na dieta

Com relação aos aspectos nutricionais, diversos pesquisadores estudaram a influência do teor de iodo na dieta canina no que tange o *status* tireóideo (BELSHAW et al., 1975; CASTILLO et al., 2001; PEIXOTO et al., 2012). Não obstante, os estudos disponíveis não são consistentes com relação ao desenvolvimento do hipotireoidismo a partir do conhecido efeito Wolff-Chaikoff decorrente de possíveis altos teores de iodo nas rações comerciais. É interessante destacar que, no Brasil, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) não exige que sejam declarados no rótulo das rações comerciais os valores mínimos e máximos dos microelementos. Como não há exigência nacional para os valores de referência de iodo nas rações comerciais, as empresas de ração e a ANFAL pet, Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação, baseiam-se em tabelas de recomendações nutricionais elaboradas por órgãos internacionais especializados no assunto como AAFCO e FEDIAF. A descrição de enriquecimento por quilograma do produto contida nas embalagens que engloba vitaminas e microelementos contém os níveis esperados de cada mineral. Todavia, este cálculo é baseado nas concentrações do elemento-traço incluídas no *premix* utilizado, desconsiderando dessa forma, o teor acumulado nos demais ingredientes adicionados à formulação. Em outras palavras, a concentração contida no produto é, provavelmente, maior do que a divulgada no rótulo, ainda que este aumento seja ínfimo. Diante disto, poder-se-ia supor que os cães estariam expostos ao consumo de níveis de iodo capazes de induzir o hipotireoidismo. Não obstante, em nosso estudo, os cães eram alimentados com rações comerciais variadas dentre as quais, os níveis de iodo por quilograma do produto variaram de 0,83 a 3,0mg (Anexo F). Considerando o consumo médio de 300g de ração por dia para cada animal, foi possível observar que o consumo de iodo diário por cão foi de 249 a 900µg, estando, portanto, até quase cinco vezes acima dos valores recomendados para o consumo diário de iodo para a espécie, corroborando estudos prévios (CASTILLO 2001; PEIXOTO et al., 2012). Segundo os autores, cães devem consumir no máximo 200µg de iodo por dia. Estes dados sugerem que atualmente diversas marcas disponíveis no mercado poderiam estar influenciando o *status* tireóideo dos animais consumidores, com relação à abundância de iodo nas formulações. Vale destacar que omissões com relação à ingestão de outros alimentos não foram consideradas nesta análise. Portanto, as concentrações de iodo relatadas neste estudo são consideradas mínimas para cada animal. Isto torna possível que estes cães venham ingerindo ainda mais iodo do que o percentual calculado.

Em contrapartida, apesar de todos os 21 animais do estudo estarem expostos ao excesso de iodo nas rações, o diagnóstico de hipotireoidismo não pode ser afirmado em nenhum dos casos. Quando analisamos os valores de referência para a espécie, é possível obter oito cães hipotireóides. Todavia, novas referências raciais estão surgindo e, dessa forma, uma avaliação mais refinada é categórica em demonstrar que estes mesmos oito animais outrora hipotireóides são, na realidade, eutireóides (HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). É importante destacar que a tireoide de animais sob o efeito Wolff-Chaikoff também responde à estimulação com TSH. Assim sendo, mesmo que estes animais estivessem sob este efeito, o diagnóstico de hipotireoidismo primário seria descartado pelo teste de estimulação

com TSH. Não obstante, múltiplos fatores necessitam ser avaliados para categorizar o efeito Wolff-Chaikoff (CALIL-SILVEIRA et al., 2016). Neste contexto, uma vez que as etapas da síntese de HT que são inibidas pelo excesso de iodo são moleculares, esta avaliação em cães necessita cautela e deveria ser executada a partir de biópsia da tireoide ou no período *post mortem* imediato para que se realize, no mínimo, a avaliação da atividade do co-transportador NIS e da enzima TPO. Portanto, qualquer sugestão estritamente clínica sobre o tema passa a ser especulativa. Além disso, considerando a característica transitória do efeito Wolff-Chaikoff (CALIL-SILVEIRA et al., 2016), a terapêutica mais simples e objetiva deveria ser baseada na modificação da dieta oferecida ao animal acometido, visto que tal fenômeno é iodo-dependente, ou seja, com a redução da concentração do microelemento, os tireócitos tendem a voltar ao seu perfeito funcionamento, dispensando, assim, a necessidade de terapia repositória hormonal.

Neste contexto, quando os resultados são analisados com a distribuição precoce em dois grupos (eutireoideos e hipotireoideos), nota-se que oito dos 21 animais estudados poderiam ser submetidos à inadequada suplementação com tiroxina. Como, até o momento, os benefícios da levo-tiroxina são exaltados em detrimento de seus possíveis efeitos deletérios, especialmente em curto prazo, estes animais provavelmente se apresentariam com maior atividade, perda de peso e melhora do pelame. Isto é, mesmo que de fato estes animais sofressem do efeito Wolff-Chaikoff, a reposição com tiroxina continuaria sendo capaz de estimular os receptores de HT e todas as suas consequências bioquímicas. Estes fatores, entre outros possíveis, corroborariam o entusiasmo por parte do tutor, bem como do médico veterinário. Em contrapartida, alguns efeitos indesejáveis poderiam surgir de forma mascarada e serão discutidos mais a frente.

6.3 Análise hematológica e bioquímica

A literatura cita que até 50% dos cães com hipotireoidismo apresentam anemia normocítica normocrômica (PARRY, 2013). Em nossos resultados, nenhum dos animais obteve o resultado de anemia. Uma vez que estes cães provavelmente não são hipotireoideos verdadeiros, de fato não seria esperado encontrar redução da série vermelha nos exames destes animais. Caso os valores de referência para Golden Retrievers não tivessem sido levados em consideração, o hemograma perderia o poder de auxílio na triagem destes pacientes. Isto é, teríamos oito animais hipotireoideos que não cursaram com anemia. Ainda assim, independente do valor de referência utilizado, o resultado estaria dentro do previsto, visto que metade dos animais com diagnóstico de hipotireoidismo não apresenta anemia.

A dosagem de colesterol identificou três animais (37,5%) portadores de hipercolesterolemia e apenas um animal (12,5%) com hipertrigliceridemia. É interessante perceber que estes quatro cães seriam considerados hipotireoideos se a referência hormonal canina tivesse sido considerada correta. Como estes cães pode ser excluídos do diagnóstico de hipotireoidismo com a referência hormonal racial, é importante entender que a causa deste aumento sérico de colesterol e triglicérides não é proveniente da redução dos níveis plasmáticos de HT. Assim sendo, outras doenças de base precisam ser pesquisadas nestes animais para que a terapêutica adequada seja estabelecida. Ademais, a partir dos dados analisados, não se pode afirmar que resultados altos de colesterol e/ou triglicérides sejam úteis na suspeita de hipotireoidismo em cães. Talvez estes parâmetros possam ter sido úteis quando a comparação dos valores hormonais não era tão refinada. Portanto, novos estudos necessitam avaliar estes parâmetros bioquímicos em comparação com referências hormonais mais específicas.

Segundo Pessina e coautores (2014), o aumento das taxas relacionadas ao metabolismo hepático não ocorre em grande parte dos cães com hipotireoidismo. De acordo com nossos resultados, podemos sugerir que a taxa de ocorrência seja ainda menor, uma vez que os animais estudados podem não ser de fato hipotireoideos. Ou seja, é possível que o aumento destas taxas não tenha sido identificado devido ao metabolismo normal destes animais.

É importante destacar que a função hepática normal é importante para o metabolismo tireoidiano, uma vez que este órgão é o principal local de conversão de T4 em T3 através da ação da desidase tipo 1. Além disso, nele ocorre a síntese de proteínas carreadoras dos HT como TBG e albumina (ADLER; WATORFSKY, 2007, 2007). Estas proteínas estão diretamente relacionadas com a concentração de T4 total.

Os dados obtidos relacionados à função renal não apresentaram variação quando comparados aos valores de referência. Da mesma forma que outros parâmetros, este resultado foi esperado visto que todos os cães são, provavelmente, normotireoideos.

Além de todas as possíveis influências questionadas até o momento, é importante ressaltar que outras possibilidades não foram descartadas. Pessina e colaboradores (2014) destacaram os fatores idade e gênero como pilares para a interpretação de exames auxiliares no diagnóstico de doenças endócrinas. Não obstante, a influência de hormônios sexuais na concentração plasmática fisiológica de colesterol e de triglicerídeos é mal definida na literatura. Enquanto alguns autores advogam que as fêmeas normalmente apresentam taxas maiores de ambos os compostos, outros não reportam diferenças atribuídas ao sexo (PESSINA et al., 2014). Outro fator interessante a ser considerado é que a referência utilizada para os níveis de colesterol e triglicerídeos é também canina. Neste mesmo contexto, nosso estudo salienta a importância de considerar erro na interpretação de exames devido a falhas nos parâmetros de referência generalistas disponíveis na medicina veterinária.

6.4 Dosagens hormonais

Os parâmetros hormonais devem ser sempre considerados em associação com a avaliação clínica. De um modo geral, é a partir desta análise em conjunto que se suscita a suspeita de hipotireoidismo.

Há diversos obstáculos para firmar o diagnóstico de hipotireoidismo em cães, por este motivo, alguns autores definem os consagrados padrões para hipotireoideos primários, ou seja, valores plasmáticos de T4 total e/ou livre abaixo da referência para a espécie associados à elevação de TSH, como diagnóstico presuntivo de hipotireoidismo primário (DIXON et al., 1996; GIZA et al., 2016).

A literatura reforça que a mensuração de TSH isolada não tem indicação e, portanto, deve ser sempre conectada aos níveis de T4 (BEHREND, 2005). É interessante destacar que a mensuração plasmática de T3 é também definida como avaliação inconsistente. Dessa forma, sabe-se que níveis normais de T3 não descartam a doença, bem como níveis abaixo da referência também não a confirmam. Esta característica variável da dosagem sérica de T3 está, entre outros motivos, atrelada à atividade das desidases, em especial, D2 e D3. A desidase do tipo 2 (D2) é a principal fornecedora de HT intracelular na sua forma ativa em todo o organismo (GEREBEN et al., 2008) e tem como principal tarefa ajustar o nível intracelular de T3, sugerindo um papel protetor diante de falhas na oferta de HT (RUDAS et al., 2005). Esta particularidade se dá devido ao aumento da estimulação da conversão de T4 em T3 frente à redução da concentração de HT que ocorre no hipotireoidismo. Esta condição culmina com a preservação dos níveis séricos de T3 por um período. Em associação a isto, D3 é responsiva à elevação de T3 e, por sua vez, reduz o *clearance* deste hormônio

concomitantemente. Dessa forma coordenada, estas enzimas contruibuem para a manutenção dos níveis de T3 e tornam a mensuração deste hormônio uma péssima escolha na tentativa de diagnosticar o hipotireoidismo (GEREBEN et al., 2015). Antigamente, acreditava-se que a dosagem de T3 reverso (T3r) seria um exame ouro na distinção entre hipotireoidismo primário e doença não tireoidiana, uma vez que estas síndromes cursam com resultados distintos neste exame. Todavia, estudos subsequentes há muitos anos demonstraram que a mensuração de T3r não tem acurácia suficiente para discriminar estes diagnósticos diferenciais (BURMEISTER, 1995).

Considerando os principais hormônios dosados para confirmação da endocrinopatia em questão, o baixo custo da dosagem sérica de T4 total quando comparado à mensuração de T4 livre por diálise faz a primeira ser de boa aceitação por parte dos tutores. Além disso, a dosagem de T4 total é um método interessante para triagem diagnóstica de hipotireoidismo em cães devido à sua alta sensibilidade. Segundo Behrend (2005), é improvável que um cão seja verdadeiramente hipotireoideo com níveis séricos de T4 total dentro dos valores de referência. Não obstante, a baixa especificidade deste teste compromete o uso frente ao diagnóstico final desta endocrinopatia (BORETTI et al., 2009). Outrossim, estudos evidenciam que a captação de HT pelos tecidos é proporcional, ainda que não seja limitada a isto, à porção livre de T4 circulante e não ao T4 total (DAMINET; FERGUSON, 2003). Por estes motivos, aliados ao fato da mensuração de T4 livre por diálise ser um método de maior acurácia quando comparado ao T4 total, uma vez que esta análise sofre menos influência de doenças não tireoidianas (BEHREND, 2005), o T4 livre por diálise foi escolhido para triar os cães de nosso estudo na tentativa de definir os grupos experimentais.

É importante destacar que nenhum animal foi submetido aos exames hormonais durante a manifestação clínica de quaisquer dermatopatias ou sob terapias que comprovadamente influenciariam no eixo HHT.

6.4.1 T4 livre por diálise

Os valores de referência para a dosagem de T4 livre por diálise para cães variam entre laboratórios, sendo os mais frequentes de 0,6 a 3,5µg/dL. É imprescindível compreender que estes valores são ditos como normais para a espécie canina como um todo, desconsiderando fatores raciais, etários e sexuais. Portanto, inicialmente, os resultados obtidos a partir da mensuração plasmática de T4 livre por diálise, incitam a separação de dois grupos de cães (eutireoideos e hipotireoideos), como observado na figura 13. Esta é uma constatação recorrente na atuação clínica do médico veterinário. Do ponto de vista diagnóstico, trata-se de um erro rotineiro. Isto porque, ao analisarmos os resultados de T4 livre por diálise obtidos em comparação aos níveis de referência para a raça Golden Retriever, segundo a publicação de Hegstad e colaboradores (2015), fica claro que, na verdade, estes valores são considerados normais para estes animais, contradizendo os testes habituais. Isto posto, após a coleta de dados de todos os 21 animais estudados, entende-se que, na realidade, nenhum dos resultados obtidos de T4 livre contempla um cão com hipotireoidismo. Dessa forma, se utilizarmos este parâmetro de referência para este estudo, diversos outros resultados se tornam melhor compreendidos. Quando somamos nesta análise os resultados da análise hematológica e bioquímica, histopatologia e diagnóstico molecular, podemos sugerir que as alterações clínicas não estão relacionadas com hipotireoidismo de fato. É fundamental que se perceba que não há na descrição dos resultados clínicos algum fator patognomônico desta doença porque, na verdade, todos os possíveis sinais clínicos associados ao hipotireoidismo em cães são completamente inespecíficos.

Dentro de nossos dados, dois resultados de T4 livre (9%) poderiam ter sido avaliados como limítrofes para a referência canina deste hormônio, se considerada 0,6ng/dL e o mesmo ocorreria se considerada a referência de 0,7ng/dL de outros laboratórios. Um equívoco muito comum na clínica de pequenos animais é firmar o diagnóstico de hipotireoidismo em cães com resultados de T4 livre por diálise próximo do valor mínimo de referência para a espécie. É importante ressaltar que há décadas diversos autores já descrevem que estes resultados limítrofes são frequentes em pacientes com doenças não tireoidianas, o que, a princípio, não justifica a terapêutica (KAPTEIN et al., 1981; WATORFSKY; BURMAN, 1982; CHOPRA, 1998).

6.4.2 Teste de estimulação com TSH

O teste de estimulação com TSH recombinante humano (rhTSH) é referido como o exame de melhor acurácia para detectar hipotireoidismo em cães (CAMPOS et al., 2012). Há mais de 3 décadas, o único TSH disponível para teste de estimulação da tireoide tanto em humanos como em cães tinha origem bovina (CAMPOS et al., 2012). Devido a relatos de efeitos adversos observados nas duas espécies, nos anos 90 surgiu o TSH de origem humana. Com o advento do uso do TSH recombinante humano, não foram relatados efeitos adversos em humanos quando respeitada a dose e a via intramuscular de administração. Em contrapartida, em cães a aplicação do fármaco na musculatura foi descrita como dolorosa (CAMPOS et al., 2012) e menos consistente no que tange à avaliação de resultados quando comparada à aplicação venosa. O mesmo foi relatado para a aplicação subcutânea (FERGUSON, 2007). Com relação a efeitos adversos, o protocolo intravenoso com a dose máxima de 150µg/animal em dose única não induziu tais consequências em cães acima de 20kg de peso corporal. De acordo com Boretti e colaboradores (2009), para animais acima de 10kg a dose de 150µg/animal permite maior precisão para distinguir a forma primária da secundária. Além disso, com a dose utilizada, é possível refinar o diagnóstico a fim de classificar o hipotireoidismo como primário, visto que cães com doença não tireoidiana exibem resultados inconsistentes de hipotireoidismo (CAMPOS et al., 2012). Não obstante, alguns autores descreveram que o uso repetido por até 3 dias seguidos na dose de 75µg/animal provocou a manifestação de efeitos indesejados (BORETTI et al., 2009; CAMPOS et al., 2012; SCOTT-MONCRIEFF, 2012). Independente de tais fatos, Daminet (2007) e Boretti (2009) e todos os coautores são categóricos ao advogar a favor do protocolo reproduzido em nosso experimento. Isso porque, segundo os autores, a estimulação por 3 dias não melhora a acurácia do teste quando comparada à dose única. Outrossim, estimular a tireoide canina com rhTSH é comprovadamente um método bastante seguro segundo nossa avaliação, corroborando dados da literatura (CAMPOS et al., 2012). Com nossos resultados, foi possível ratificar estes dados através da análise de diversos fatores clínicos como frequência cardiorrespiratória, tempo de preenchimento capilar, coloração de mucosas, temperatura, bem como avaliação de reflexo pupilar e de percepção do animal frente a estímulos ambientais. Estes resultados foram de suma importância no que tange a ausência de efeitos não desejados com o uso de rhTSH, uma vez que a literatura pouco cita a análise detalhada destes parâmetros. Diante de todos esses dados, o custo do hormônio sintético para a estimulação da tireoide se torna o único impeditivo para seu uso rotineiro na prática clínica.

A interpretação do teste pode variar de acordo com a literatura consultada. Independentemente deste fato, uma vez que a tireoide seja estimulada pelo TSH, o resultado esperado de um cão sem doença tireoidiana é o aumento dos níveis de HT. Mais especificamente, em 2007, Daminet e colaboradores descreveram que a interpretação do teste de estimulação com TSH deve ser negativa para hipotireoidismo quando o valor pós TSH

exceder 40nmol/L e/ou ocorrer um aumento de pelo menos 20nmol/L entre os valores obtidos. Em nosso estudo, apenas um dos 12 cães obteve resultado abaixo do ponto de corte citado, porém a variação entre os resultados pré e pós TSH foi de 20,7nmol/L. Esta variação o coloca dentro dos valores normais de referência. Ainda que houvesse questionamento com relação ao valor limítrofe, outra análise do teste endócrino pode ser realizada. Dois anos após desta referência de interpretação, Boretti e coautores descreveram que, na verdade, o valor de T4 total após a estimulação deve ser acima de 2,5µg/dL e 1,5 vezes maior que o valor de T4 total basal, isto é, pré-estimulação com TSH. Este padrão de normalidade foi revelado em 100% dos cães estudados, inclusive no único citado neste momento (Anexo J). Desta forma, é possível compreender que todos os 12 cães submetidos ao teste de estimulação com TSH neste estudo são, na verdade, animais eutireoideos. Caso este teste não fosse realizado, poderíamos ter descrito dois grupos de animais, um deles com hipotireoidismo caso a análise comparativa de referência fosse canina e não racial. É importante destacar que este teste refinado não é utilizado na rotina clínica devido ao alto custo. Sendo assim, são utilizadas as mensurações de T4 seja livre ou total, associadas ou não ao valor de TSH. Por conseguinte, podemos sugerir que há até hoje o hiperdiagnóstico de hipotireoidismo como Scott e colaboradores já haviam relatado desde os anos 90. Ou seja, há mais diagnósticos de hipotireoidismo do que verdadeiramente cães hipotireoideos, demonstrando o excesso de diagnósticos falso positivos com os exames de rotina.

Diante da problemática relacionada a não utilização do teste de estimulação com TSH na prática clínica, é possível sugerir que, ao utilizar a dosagem de T4 livre como método de diagnóstico, a referência utilizada deve ser aquela relacionada à raça e não à espécie. Além disso, tendo em vista os novos estudos que vêm surgindo na área, é possível que nos próximos anos, esta análise seja ainda mais fidedigna com possíveis novas referências classificadas não só de acordo com a espécie e raça, mas também considerando gênero e faixa etária de interesse diagnóstico.

Nossos resultados reafirmaram a importância da utilização dos intervalos de referência raciais. Ao analisar os dados obtidos, principalmente, através da associação da mensuração de T4 livre por diálise e TSH, percebemos que 38% dos animais seriam considerados hipotireoideos. Em compensação, quando os valores obtidos são enquadrados na referência mais recente para Golden Retriever (HEGSTAD-DAVIES et al., 2015), é possível perceber que, na realidade, tratam-se de cães hígidos. Outrossim, este novo IR, corrobora os resultados responsivos ao teste de estimulação com rhTSH. Fica claro, portanto, que em análises clínicas grosseiras, estes animais seriam submetidos à suplementação hormonal, quando obviamente, não necessitam desta reposição. Este paradigma frequente na rotina clínica de cães suspeitos de hipotireoidismo, promove gastos desnecessários com exames e tratamentos hormonais em cães relativamente jovens, bem como induz a exclusão dos mesmos de programas de cruzamento, afetando a diversidade genética. Além disso, a prevalência de hipotireoidismo passa a ser erroneamente superestimada (HEGSTAD-DAVIES et al., 2015).

6.4.3 TSH

De acordo com a referência canina, para os níveis de TSH, teríamos 100% dos animais com valores normais. Todavia, esta avaliação é precoce e, atualmente, deve ser desestimulada. Segundo estudos mais recentes (FRIEDRICHS et al., 2012), devemos ter como base as referências mais uniformes existentes. Neste caso, a referência racial de Hegstad-Davies e colaboradores define que entre 0,03 e 0,32ng/ml os valores são normais e acima destes, temos TSH acima do ideal, sugerindo hipotireoidismo primário quando associada à queda na

concentração plasmática de T4, especialmente livre. Outra possibilidade de interpretação é o hipotireoidismo subclínico quando os valores de T4 estão dentro da referência e os de TSH, acima (ALLPORT et al., 2013). Nosso resultado, portanto, poderia caracterizar 62% de cães eutireoideos e 38% de cães com hipotireoidismo subclínico. Este padrão é bem estabelecido em medicina, já em medicina veterinária, não há estudos que utilizem esta classificação, mas os resultados obtidos podem ser comparados a este paradigma. Não obstante, não há consenso em medicina quanto ao tratamento de pacientes hipotireoideos subclínicos, especialmente quando não é realizada a titulação de anticorpos tão importante para humanos (ALLPORT et al., 2013).

Apesar do TSH ser liberado episodicamente ou em flutuação, as variações entre espécie parecem ser muito mais importantes, segundo Hegstad-Davies (2015). Os autores ainda levantam a hipótese de que haja variação de *set point* da hipófise e tireoide entre indivíduos e entre raças, uma vez que os menores valores de T4 não correspondem a valores mais elevados de TSH e o contrário também é verdadeiro. Estes mecanismos fisiológicos ainda não estão elucidados na literatura, embora autores discutam a possibilidade do envolvimento de função e afinidade de receptores para HT, bem como a sensibilidade hipofisária para os mesmos. Inclusive, um estudo abordando este tema em Beagles demonstrou que a variação no mesmo indivíduo é muito menor que a mesma entre cães da mesma raça (IVERSEN et al. 1999).

Os valores normais da concentração plasmática de TSH encontrados em nosso estudo em 62% dos animais hipotireoideos sobrepõem dados da literatura. Segundo estudos, entre 25 a 30% dos cães com hipotireoidismo não apresentam resultados elevados de TSH, o que torna esta dosagem pouco sensível para diagnóstico, ainda que seja suficientemente específica (PETERSON et al., 1997; KOOISTRA et al., 2000). Considerando nossos resultados, é possível perceber que esta porcentagem seja ainda maior. Isso porque cães com doenças não tireoidianas capazes de reduzir os níveis plasmáticos de T4 (total e livre) também podem cursar com níveis normais de TSH, impedindo a diferenciação fundamental para o diagnóstico entre eles (CAMPOS et al., 2012). Nossos dados poderiam ratificar a literatura sobre o tema caso a referência canina fosse adotada. Nesta análise, oito dos 21 cães (31%) seriam hipotireoideos de acordo com a associação de T4 livre por diálise e TSH. Destes, apenas um (12%) apresentariam resultados de TSH plasmáticos dentro dos valores de referência para a espécie (0,01 a 0,50ng/ml). É importante destacar que, por meses, a concentração plasmática de TSH está elevada em cães com hipotireoidismo primário, todavia, esta concentração reduz gradualmente até entrar na faixa de referência para a espécie. De modo geral, receptores são reguladores das atividades celulares, todavia eles também estão sujeitos à regulação. Assim, uma célula pode responder a qualquer estímulo controlando a expressão e a atividade de seus receptores. O fenômeno de redução dos efeitos via receptor frente ao seu estímulo caracteriza a dessensibilização destes receptores (MAENHAUT et al., 1992). Segundo Diaz-Espineira e coautores (2008), é possível que a estimulação contínua de tireotrofos via retroalimentação do eixo HHT em cães com hipotireoidismo primário espontâneo propicie a dessensibilização de receptores de TRH, culminando com a redução da secreção de TSH. Esta consequência coloca o TSH em níveis plasmáticos dentro da normalidade para cães, bem como promove irresponsividade à estimulação com TRH. Este fator caracteriza a mensuração de TSH em cães pouco confiável e faz com que tenhamos que utiliza-la com cautela. Isto é, um resultado acima da referência utilizada reforça a suspeita de hipotireoidismo, contudo, um resultado abaixo, não exclui a possibilidade da doença. Além disso, Hegstad-Davies e coautores (2015) descrevem que, quando comparados com outras raças, os Golden Retrievers em especial apresentam IR de TSH e T4 total e livre ainda menores que outras raças, reforçando a necessidade de padronizar de forma cada vez mais restrita os valores de referência.

6.5 Síndrome do Eutireoideo Doente

A síndrome do eutireoideo doente continua sendo um grande dilema no que tange a necessidade de tratamento (ADLER; WARTOFSKY, 2007). Isto porque, além da dificuldade para excluir este distúrbio, ainda não está claro na literatura se a redução dos HT ocorre como resposta fisiológica para reduzir o metabolismo do animal por um período transitório com objetivo de conservar energia frente à doença de base ou se, na verdade, compreende uma má adaptação do organismo que deve ser tratada com reposição hormonal (CAMPOS et al., 2012). Como o déficit de HT pode agravar as comorbidades, diversos pesquisadores discursam sobre os benefícios do tratamento. Não obstante, a administração indevida de T4 não está livre de efeitos adversos, o que mantém a terapêutica do eutireoideo doente controversa (ADLER; WARTOFSKY, 2007). Em 2010, Fine e colaboradores descreveram casos de tireotoxicose iatrogênica, um deles inclusive em Golden Retriever. No relato, os animais desenvolveram taquicardia, taquipneia, agitação, hipertermia, diarreia, entre outros sinais clínicos. Os autores descrevem que tanto animais hipotireoideos com doses altas de levotiroxina sódica, como eutireoideos erroneamente diagnosticados são susceptíveis ao hipertireoidismo iatrogênico (ADLER; WARTOFSKY, 2007). Outrossim, além da tiroxina ser um hormônio catabólico, quando os sinais clínicos do cão suspeito são atribuídos ao hipotireoidismo e os testes hormonais são inconsistentes, a instituição da reposição hormonal pode favorecer a melhora do quadro clínico, mascarando a real causa base de todo o processo, ou seja, a doença não tireoidiana (BEHREND, 2005). Este paradigma representa, portanto, a principal adversidade da terapêutica inapropriada. Neste contexto, Van Den Berghe e colaboradores (2002) sugeriram a administração de TRH como normalizador dos níveis plasmáticos de HT durante um período crítico para minimizar o risco de atingir níveis supra-fisiológicos de HT. Contudo, não se pode desprezar que é descrita a redução da atividade da 5'-desiodase na síndrome do eutireoideo doente. Esta enzima, por sua vez, decresce a conversão de T4 em T3 em diversos tecidos e, conseqüentemente, reduz a concentração sérica de T3 (BURMAN; WARTOFSKY 2001). Por este motivo, a literatura sugere que, diante da escolha em instituir a reposição hormonal frente a um quadro de doença não tireoidiana, deve-se optar pelo T3 e não pelo T4 para driblar a falha na conversão periférica dos HT (BRENT; HERSHMAN, 1986). Todavia, a reposição com T3 é mais onerosa e requer maior frequência de administração dentro do período de 24 horas devido a menor meia vida da molécula, o que dificulta a adesão do tutor. É importante considerar, ainda, que diante de um paciente com sinais clínicos discretos associados a resultados de dosagens hormonais limítrofes, a solicitação de novos testes após um determinado período de tempo, como um ou dois meses não promoverá significativa piora do quadro clínico e pode permitir a idoneidade do diagnóstico (BEHREND, 2005). Não obstante, a literatura sugere que naqueles casos em que há doença concomitante que inviabilize o diagnóstico preciso do hipotireoidismo, a suplementação de HT pode favorecer a melhora clínica do paciente, especialmente nos casos de doenças graves (BEHREND, 2005).

6.6 Análise molecular – RT-PCR

As análises moleculares realizadas pelo método de PCR em tempo real foram realizadas após confirmação da viabilidade da técnica com os resultados de GAPDH. Este gene foi utilizado como referência para o ensaio. O dado mais interessante é que este é um gene bastante usual em técnicas de PCR por ser improvável a sua variação frente a desafios homeostáticos. Todavia, particularmente em alterações tireoidianas, o gene ciclofilina é

preferido. Isto porque, o GAPDH pode sofrer variação entre grupos experimentais relacionados a distúrbios tireoidianos. Apesar disto, o resultado da expressão de GAPDH não demonstrou significância estatística entre os grupos, provando que foi um gene de referência adequado para o ensaio.

6.6.1 Desiodases

Há muitas décadas, diversos estudos vêm surgindo esclarecendo mecanismos envolvidos no metabolismo periférico dos HT (COUTREAU et al., 1996; MAIA et al., 2005; GEREBEN et al., 2015). Neste contexto, a compreensão do papel das selenoproteínas desiodases se torna fundamental para elucidar os distúrbios extratireoidianos. Há anos, a combinação entre as ações de D2 e D3 são entendidas, de certa forma, como um meio celular próprio de regular a concentração hormonal tecidual sem afetar a concentração hormonal sérica (SALVATORE, 2011). Não obstante, a completa compreensão dos mecanismos a cerca das desiodases ainda depende de muitas pesquisas, portanto, optamos por analisar a expressão da isoforma do tipo 2 responsável por participar de processos de ativação e inativação dos HT. Suas alterações são conhecidas com relação às atividades em casos de hipotireoidismo. Isto é, D2 mostra-se mais estimulada diante de uma menor oferta de HT no tecido (GEREBEN et al., 2008). Em contrapartida, não há estudos na literatura que comprovem a expressão de D2 na pele tanto de cães hígidos, como frente a desafios homeostáticos. Neste contexto, é importante destacar o estudo de Olivares e colaboradores (2007) no qual demonstraram a expressão da desiodases tipo 3 no miocárdio de ratos apenas após serem submetidos ao infarto, isto é, este tecido não expressa D3 em ratos não infartados. No caso desta desiodase, a disponibilidade de oxigênio interfere em sua distribuição (JO et al., 2012). Sendo assim, é possível suscitar a possibilidade de cães expressarem D2 na pele, e até D1, apenas após um desafio homeostático, como é o caso do hipotireoidismo. Em nosso estudo, foi possível observar que não houve diferença significativa na expressão de D2 entre os grupos estudados. Existem algumas possibilidades para este resultado: a primeira delas é considerar que todos os 12 animais avaliados são normotireoideos e, portanto, não seria esperada a diferença entre os grupos. Esta possibilidade é sustentada pela definição de hipotireoidismo a partir da análise de valores de referência hormonal específicos da raça e não somente da espécie, como é feito rotineiramente entre os clínicos. A outra possibilidade que não pode ser descartada é que, caso haja a verdadeira divisão entre eutireoideos e hipotireoideos, deve-se considerar que em casos de hipotireoidismo, a atividade de D2 é estimulada e, em contrapartida, sua expressão tende a reduzir. Caso esta premissa seja real, a atividade de D2 deveria estar aumentada e os valores encontrados de sua expressão refletem uma redução em consequência da hiperatividade enzimática. Este paradigma sugere que os mecanismos de regulação da expressão gênica das desiodases tipo 2 possam ser regulados pelos níveis de HT que chegam ao tecido. Dessa forma, embora seja sabido que diversos outros mecanismos não estudados possam estar relacionados com o estabelecimento da síndrome do eutireoideo doente em cães, podemos ressaltar o papel da expressão das desiodases tipo 2 nesta regulação em cães da raça Golden Retriever. É importante destacar que novos estudos necessitam ser realizados para averiguar a possível alteração da atividade da desiodases tipo 2 no contexto proposto neste estudo. Dessa forma, é possível que, a longo prazo, novos alvos terapêuticos surjam e sejam mais objetivos na correção dos níveis tireoidianos sem interferir diretamente na glândula tireoide.

6.6.1 Receptor de hormônio tireoidiano (Tr β)

Os receptores de hormônios tireoidianos são expressos virtualmente em todos os tecidos do organismo e estão vulneráveis a variações de acordo com provocações homeostáticas a que possam ser expostos, como demonstrado em um estudo por Rudas e colaboradores (2005) no qual houve alteração na expressão de receptores Tr β na indução de hipotireoidismo em cérebro de galinhas.

Dentre os receptores de HT, optamos por avaliar a expressão de Tr β pelo método de PCR em tempo real, pois independente de sua isoforma expressa, este receptor tem como característica propiciar a atuação genômica de T3. Em compensação, o receptor do tipo Tr α em sua isoforma Tr α 2 não possui sítio de ligação para T3 e, além disso, quando expresso diminui a resposta genômica do hormônio tireoidiano. Dessa forma, podemos sugerir que diante das variações de expressão de Tr β estaríamos sempre observando a possibilidade de aumento ou diminuição da capacidade de ligação de T3, independente do receptor ser do subtipo 1, 2 ou 3. Em contrapartida, ao estudar genes inespecíficos de Tr α , não seria possível distinguir qual isoforma estaria prevalecendo no ensaio e, como são de certa forma antagônicas, as interpretações de resultados relacionados a suas expressões teciduais seriam inconsistentes.

Dentro de nossos resultados, é possível perceber que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quando distribuídos em eutireoideos e hipotireoideos pela classificação de referência da espécie para T4 livre. Mais uma vez, este resultado também permite algumas interpretações. Caso esta diferenciação em grupos seja descartada tanto pelo uso da referência racial de Goldens Retrievers, quanto pelos resultados do teste de estimulação da tireoide com rhTSH, ficaria claro que estaríamos, na realidade, diante de 12 animais normotireoideos. Assim sendo, neste grupo homogêneo, não seria esperada a variação estatística da expressão de Tr β entre os cães estudados nesta segunda fase do estudo. Em contrapartida, ao analisarmos os animais na sua distribuição de grupos, percebemos que mesmo quando comparamos duas classificações distintas de *status* tireoidiano, não foi demonstrado o aumento, tampouco a redução na expressão dos receptores estudados. Algumas condições podem ajudar na interpretação deste resultado diante da distinção de grupos. Entre as possibilidades descritas na literatura, uma situação bastante estudada é a resistência de receptores de HT, especificamente Tr β (CANADAS, et al., 2011; SHIWA et al., 2011; DUMITRESCU; REFETOFF, 2013). Nesta circunstância, os resultados da concentração plasmática de HT estariam acima da referência normal e, ainda assim, o organismo apresentaria discretamente sinais clínicos de hipotireoidismo. É importante ressaltar que associada à avaliação da concentração de HT, nesta condição de resistência, os valores plasmáticos de TSH são normais ou discretamente acima da referência normal (SHIWA et al., 2011), como foi evidenciado em nosso estudo. Trata-se de uma situação rara, porém se esta conjuntura for considerada, é possível que os resultados de T4 precocemente avaliados como normais, sejam na verdade reflexo do acúmulo plasmático frente à relativa redução da expressão de Tr β . Ou seja, uma possível diminuição da expressão real de Tr β , estaria mantendo os níveis de T4 elevados e, possivelmente T3 e, desta forma, o resultado observado colocou estes hormônios dentro da referência de forma relativa.

É indiscutível que outros parâmetros devem ser considerados para suscitar a possibilidade de resistência de Tr β , como a atividade das desidases, a expressão de transportadores de HT, entre outros. Não obstante, a manutenção da expressão de D2 entre os grupos experimentais estudados, insinua a possibilidade do aumento em atividade desta enzima no grupo hipotireoideo. Como este importante fator não foi analisado, fica evidente a necessidade de novos estudos contribuindo para toda esta interpretação.

6.7 Aspectos histológicos

Na literatura, diversos autores estudaram as alterações histológicas compatíveis com endocrinopatias (CREDILLE et al., 2001; GONZÁLEZ et al., 2013). Embora González e colaboradores (2013) advoguem pela histopatologia como importante ferramenta no diagnóstico de hipotireoidismo, os critérios de diagnóstico seguidos não foram os atualmente adotados pela literatura. Adicionalmente, nossos resultados não sustentam esta hipótese e, em contrapartida não são capazes de refugar a mesma. No entanto, é possível interpretar que nossos achados corroboram outros estudos (CREDILLE et al., 2001) que revelam inconsistência nos achados histológicos de cães suspeitos de hipotireoidismo.

Segundo a literatura, a maioria dos achados histológicos da pele de cães com hipotireoidismo pode ser observada em diversas endocrinopatias, demonstrando inespecificidade das alterações (GROSS et al., 2005; MÜNTENER et al., 2012). Contudo, alguns pesquisadores sugerem que a hipertrofia e vacuolização de músculos eretores do pelo, bem como mixedema sejam características fortemente sugestivas de hipotireoidismo em cães (GONZÁLEZ et al., 2013). Segundo eles, como os animais hipotireoideos são termofílicos, ou seja, são mais sensíveis ao frio, o eriçamento dos pelos seria uma forma de se proteger da perda de calor devido a formação de uma camada de ar entre os pelos eretos. Este levantamento dos pelos se dá pela contração do músculo eretor do pelo que, por ser acionado repetidamente, tende a hipertrofiar. Não obstante, há de se considerar que cães naturalmente mais sensíveis às baixas temperaturas, cães com pelagem menos densa e, ainda, cães em defesa ou ataque também tendem a eriçar os pelos, especialmente da região dorsal, onde são mais numerosos (GONZÁLEZ et al., 2013). Dessa forma, também promovem a hipertrofia do músculo piloerector. Outra característica considerada importante de ser avaliada frente a uma suspeita de hipotireoidismo é o grande número de folículos pilosos em fase telógena e kenógena (MÜNTENER et al., 2012). De onde se compreende que a diminuição do estímulo hormonal é capaz de interferir no ciclo de vida dos pelos, culminando com acúmulo de folículos na fase que precede a queda (telógena) ou já após a mesma (kenógena). Em nosso estudo, os animais analisados apresentavam as três características supracitadas e nenhum foi comprovado com diagnóstico de hipotireoidismo. Isto posto, demonstra que não houve correlação com os achados histológicos e o diagnóstico hormonal de hipotireoidismo. É importante salientar que a distribuição dos 12 animais estudados em grupos é questionável devido a dois fatores: (1) utilização de referência racial para T4 livre e TSH e (2) a estimulação tireoidiana com TSH. Dessa forma, sugere-se que a histopatologia seja avaliada com cautela e sempre associada aos testes endócrinos, contradizendo as conclusões de outros autores (MÜNTENER et al., 2012). A partir de nossos dados, podemos sugerir que o exame histopatológico da pele de cães sob suspeita de hipotireoidismo somente seja justificado diante da necessidade de auxílio na exclusão de diagnósticos diferenciais para doenças cutâneas. Isto é possível uma vez que estes resultados foram comparados os teste de estimulação da tireoide que é o exame de padrão ouro para a detecção de hipotireoidismo em cães.

6.8 Considerações Diagnósticas

A importância do correto diagnóstico do hipotireoidismo em cães vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisadores (BEHREND, 2005; FINE et al., 2010; SCOTT-MONCRIEFF, 2012). Adicionalmente, as adversidades da terapia hormonal repositora em cães hígidos ainda vêm sendo descritas. Atualmente, acredita-se que a sobrecarga cardiovascular pode ser o maior prejuízo para cães tratados erroneamente (FINE et al., 2010). Não obstante, é imprescindível entender que o tratamento com tiroxina pode, inicialmente, levar a inúmeros benefícios decorrentes da aceleração metabólica, como perda de peso,

proventos comportamentais, recuperação ou melhora da pelagem, inclusive em cães eutireoideos (BEHREND, 2005) e tudo isto induz o médico veterinário a acreditar que está seguindo uma excelente conduta visto todos os prós da terapia. Não podemos esquecer que diante de todas as boas alterações decorrentes do uso da tiroxina, os tutores se apresentam fascinados e totalmente adeptos ao tratamento. Se não houvesse prejuízos ao organismo animal, este não seria um problema. Todavia, ainda não se sabe se futuramente cães tratados para hipotireoidismo devido a erro no diagnóstico, terão malefícios decorrentes desta prática. Não obstante, é importante lembrar que, caso o paciente seja portador da síndrome do eutireoideo doente, possivelmente a doença não tireoidiana estará sendo mascarada com o uso da tiroxina. Dessa forma, os prejuízos desta enfermidade não diagnosticada podem ser diversos. Ademais, não se pode esquecer que a tiroxina é um hormônio catabólico e, portanto, seus efeitos podem ser catastróficos diante de uma doença ainda não diagnosticada e silenciosa.

Em contrapartida, com a redução de diagnósticos equivocados e eliminação de gastos com exames complementares diagnósticos, bem como os de monitoramento e tratamento, está o risco de não identificar animais candidatos a desenvolver hipotireoidismo de fato e ignorar valores preditivos da doença. Dessa forma, admite-se a necessidade de novos estudos que possam sugerir estes parâmetros indicativos do estabelecimento de hipotireoidismo subsequente.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo conclui que a falta de relação entre os parâmetros hematológicos, bioquímicos, histológicos e moleculares estudados pode ser consequência somente da falha no diagnóstico do hipotireoidismo em cães da raça Golden Retriever.

Este estudo foi capaz de demonstrar que estas falhas são recorrentes no diagnóstico clínico e laboratorial do hipotireoidismo em cães. Neste contexto, destacaram-se os valores de referência utilizados atualmente na prática clínica. Estes foram constatados parâmetros grosseiros que prejudicam a conclusão diagnóstica concreta da doença. Percebe-se, ainda, a necessidade de refinar mais ainda estas classificações normais para todos os dados estudados. Além disso, sugere-se a inclusão de referências ainda mais específicas, como por faixa etária e gênero, para aprimorar mais ainda o diagnóstico desta e de outras endocrinopatias.

Enquanto novos estudos não surgem, a sugestão final deste estudo é que os cães suspeitos de hipotireoidismo sejam submetidos à mensuração de T4 livre por diálise combinada com a dosagem de TSH e que a interpretação dos resultados seja feita a partir da utilização dos novos intervalos de referência raciais já publicados. Além disso, sugere-se que os exames complementares hematológicos, bioquímicos e histopatológicos sejam utilizados com cautela. O uso destes exames se justifica diante da necessidade de excluir diagnósticos diferenciais e/ou constatar comorbidades associadas à suspeita de hipotireoidismo. Dessa forma, o clínico de pequenos animais estará visando melhorar a interpretação dos resultados obtidos a partir de animais suspeitos de hipotireoidismo e reduzir o número de diagnósticos errôneos e, portanto, superestimados desde que o hipotireoidismo canino é estudado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, Suzanne Myers; WARTOFSKY, Leonard. The nonthyroidal illness syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 36, n. 3, p. 657-672, 2007.

ÅHLGREN, Johanna; UIMARI, Pekka. Heritability of hypothyroidism in the Finnish Hovawart population. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 1, p. 1, 2016.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ALLAIN, Charles C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.

ALLPORT, Jack et al. Why are GPs treating subclinical hypothyroidism? Case note review and GP survey. **Primary Health Care Research & Development**, v. 14, n. 02, p. 175-184, 2013.

ANTONINI, Dario et al. An intimate relationship between thyroid hormone and skin: regulation of gene expression. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, 2013.

Approved Recommendation (1985) on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 3: IFCC Method for Alanine Aminotransferase (EC 2.6.1.2). **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.24, p.481-495, 1986.

ASTAPOVA, Inna. Role of co-regulators in metabolic and transcriptional actions of thyroid hormone. **Journal of molecular endocrinology**, v. 56, n. 3, p. R73-R97, 2016.

BALOGH, L. et al. Thyroid volumetric measurement and quantitative thyroid scintigraphy in dogs. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 46, n. 2, p. 145-156, 1997.

BASSETT, JH Duncan; HARVEY, Clare B.; WILLIAMS, Graham R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 213, n. 1, p. 1-11, 2003.

BAUER, J. E. Metabolismo comparado de lípidos y lipoproteínas. **Pet' s Ciencia**, v. 13, 1997.

BEALE, K. M. et al. Correlation of racing and reproductive performance in greyhounds with response to thyroid function testing. **The Journal of the American Animal Hospital Association**, 1992.

BEALE, K. M.; HALLIWELL, R. E.; CHEN, C. L. Prevalence of antithyroglobulin antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay of canine serum. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 5, p. 745-748, 1990.

BECK-PECCOZ, P. et al. Syndromes of hormone resistance in the hypothalamic–pituitary–thyroid axis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 529-546, 2006.

BEHREND NE. **Can canine hypothyroidism really be diagnosed?** In: Proceedings 23rd annual ACVIM Forum, Baltimore, MD; 2005

BEIERWALTES, WILLIAM H.; NISHIYAMA, RONALD H. Dog thyroiditis: occurrence and similarity to Hashimoto's struma. **Endocrinology**, v. 83, n. 3, p. 501-508, 1968.

BELSHAW, BRUCE E.; COOPER JR, THOMAS B.; BECKER JR, DAVID V. The iodine requirement and influence of iodine intake on iodine metabolism and thyroid function in the adult beagle. **Endocrinology**, v. 96, n. 5, p. 1280-1291, 1975.

BERNAL, Juan; GUADAÑO-FERRAZ, Ana; MORTE, Beatriz. Thyroid hormone transporters [mdash] functions and clinical implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 7, p. 406-417, 2015.

BIANCHI, Matteo et al. A Multi-Breed Genome-Wide Association Analysis for Canine Hypothyroidism Identifies a Shared Major Risk Locus on CFA12. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0134720, 2015.

BIANCO, Antonio C. Cracking the code for thyroid hormone signaling. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 26, 2013.

BIANCO, Antonio C.; KIM, Brian W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 10, p. 2571, 2006.

BIGLER, B. Thyroxine-binding serum proteins in the cat as compared to dog and man. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v. 118, n. 12, p. 559-562, 1976.

BODEY, A. R.; RAMPLING, M. W. Comparison of haemorrhological parameters and blood pressure in various breeds of dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, n. 1, p. 3-6, 1999.

BORETTI, F. S. et al. Comparison of 2 doses of recombinant human thyrotropin for thyroid function testing in healthy and suspected hypothyroid dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 4, p. 856-861, 2009.

BRENT, Gregory A. Mechanisms of thyroid hormone action. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3035-3043, 2012.

BRÖMEL, C. et al. Ultrasonographic evaluation of the thyroid gland in healthy, hypothyroid, and euthyroid golden retrievers with nonthyroidal illness. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 19, n. 4, p. 499-506, 2005.

BUCOLO, Giovanni; DAVID, Harold. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clinical chemistry**, v. 19, n. 5, p. 476-482, 1973.

BÜRGI, Hans. Iodine excess. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 107-115, 2010.

BURMAN, Kenneth D.; MCKINLEY-GRANT, Lynn. Dermatologic aspects of thyroid disease. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 4, p. 247-255, 2006.

BURMEISTER, Lynn A. Reverse T3 does not reliably differentiate hypothyroid sick syndrome from euthyroid sick syndrome. **Thyroid**, v. 5, n. 6, p. 435-441, 1995.

CALIL-SILVEIRA, Jamile et al. Iodide excess regulates its own efflux: a possible involvement of pendrin. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 310, n. 7, p. C576-C582, 2016.

CAMPOS, Miguel et al. Recombinant human thyrotropin in veterinary medicine: current use and future perspectives. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 4, p. 853-862, 2012.

CANADAS, Karina T. et al. Resistance to thyroid hormone associated with a novel mutation of the thyroid β receptor gene in a four-year-old female. **International Journal Of Pediatric Endocrinology**, v. 2011, n. 1, p. 3, 2011.

CARNEIRO, J; JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia Básica**: texto, atlas. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

CASTILLO, V. A. et al. Nutrition: Commercial diet induced hypothyroidism due to high iodine. A histological and radiological analysis. **Veterinary Quarterly**, v. 23, n. 4, p. 218-223, 2001.

CASTILLO, Víctor; RODRÍGUEZ, María S.; LALIA, José. Estimulación con TRH y evaluación de la respuesta de la TSH en perros. Su importancia en el diagnóstico de la enfermedad tiroidea subclínica (hipotiroidismo subclínico y tiroiditis autoinmune eutiroides). **Revista Científica**, v. 11, n. 1, 2001.

CHASTAIN, C. B.; GANJAM, V. K.. **Clinical Endocrinology of Companion Animals**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1986.

CHENG, Sheue-Yann; LEONARD, Jack L.; DAVIS, Paul J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocrine reviews**, v. 31, n. 2, p. 139-170, 2010.

CHOPRA, INDER J. A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T4) to 3, 3', 5-triiodothyronine (T3) in vitro. **Endocrinology**, v. 101, n. 2, p. 453-463, 1977.

CHOPRA, Inder J. Simultaneous measurement of free thyroxine and free 3, 5, 3'-triiodothyronine in undiluted serum by direct equilibrium dialysis/radioimmunoassay: evidence that free triiodothyronine and free thyroxine are normal in many patients with the low triiodothyronine syndrome. **Thyroid**, v. 8, n. 3, p. 249-257, 1998.

CORBEE, Ronald J. Obesity in show dogs. **Journal of Animal Physiology And Animal Nutrition**, v. 97, n. 5, p. 904-910, 2013.

COSTA, Nina Quintanilha, et al. "Análise morfológica, topográfica e do suprimento sanguíneo da glândula tireóide em cães (Canis familiaris)." **Confict** (2013).

- CREDILLE, K. M. et al. The effects of thyroid hormones on the skin of beagle dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 6, p. 539-546, 2001.
- DAMINET, Sylvie; FERGUSON, Duncan C. Influence of drugs on thyroid function in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 4, p. 463-472, 2003.
- DANIEL, Gregory B.; NEELIS, Dana A. Thyroid scintigraphy in veterinary medicine. In: **Seminars in Nuclear Medicine**. WB Saunders, 2014. p. 24-34.
- DAVISON, L. J. et al. The Canine POMC Gene, Obesity in Labrador Retrievers and Susceptibility to Diabetes Mellitus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 2, p. 343-348, 2017.
- DE MARCO, Viviani; LARSSON, Carlos Eduardo. Hipotireoidismo na espécie canina: avaliação da ultra-sonografia cervical como metodologia diagnóstica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 747-753, 2006.
- DE SOUZA, E. C. et al. MCT8 is Downregulated by Short Time Iodine Overload in the Thyroid Gland of Rats. **Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme**, v. 47, n. 12, p. 910-915, 2015.
- DENTICE, Monica et al. The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 7, p. 3937-3945, 2013.
- DIAZ-ESPINEIRA, M. M. et al. Functional and morphological changes in the adenohypophysis of dogs with induced primary hypothyroidism: loss of TSH hypersecretion, hypersomatotropism, hypoprolactinemia, and pituitary enlargement with transdifferentiation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 35, n. 1, p. 98-111, 2008.
- DIXON, R. M.; REID, S. W.; MOONEY, C. T. Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. **The Veterinary Record**, v. 145, n. 17, p. 481-487, 1999.
- DUMITRESCU, Alexandra M.; REFETOFF, Samuel. The syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 7, p. 3987-4003, 2013.
- DYCE, Keith M.; SACK, Wolfgang O.; WENSING, Cornelis Johannes Gerardus. **Textbook of veterinary anatomy**. Elsevier Health Sciences, 2009.
- ELLIOTT, Denise A.; KING, Lesley G.; ZERBE, Carole A. Thyroid Hormone Concentrations In Critically III Canine Intensive Care Patients. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 5, n. 1, p. 17-23, 1995.
- ENG, P. H. et al. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 139-144, 2001.

ESPINEIRA, M. M. et al. Assessment of thyroid function in dogs with low plasma thyroxine concentration. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 21, n. 1, p. 25-32, 2007.

FELDMAN EC, NELSON RW. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 3rd ed. St. Louis (MO) W.B. Saunders; 2004. p. 86- 151.

FERGUSON, Duncan C. Testing for hypothyroidism in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 37, n. 4, p. 647-669, 2007.

FINE, Deborah M.; TOBIAS, Anthony H.; BONAGURA, John D. Cardiovascular manifestations of iatrogenic hyperthyroidism in two dogs. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 12, n. 2, p. 141-146, 2010.

FOSSATI, Pierro; PRENCIPE, Lorenzo. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, 1982.

FOX, L. E.; NACHREINER R. F. "The pharmacokinetics of T3 and T4 in the dog." **Proc 62nd Conf Res Workers in Anim Dis**. Vol. 13. 1981.

FRANK, Linda A. Comparative dermatology—canine endocrine dermatoses. **Clinics in dermatology**, v. 24, n. 4, p. 317-325, 2006.

FRIEDRICHS, Kristen R. et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 4, p. 441-453, 2012.

GALAS, Ludovic et al. TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 164, n. 1, p. 40-50, 2009.

GELLA, F. Javier et al. A simple procedure for the routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. **Clinica chimica acta**, v. 153, n. 3, p. 241-247, 1985.

GEREBEN, B. et al. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 570, 2008.

GEREBEN, Balázs et al. Scope and limitations of iodothyronine deiodinases in hypothyroidism. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 11, n. 11, p. 642, 2015.

GERMAN, Alexander J. Style over substance: what can parenting styles tell us about ownership styles and obesity in companion animals?. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S1, p. S72-S77, 2015.

GIZA, Elżbieta Gabriela et al. Electrodiagnostic studies in presumptive primary hypothyroidism and polyneuropathy in dogs with reevaluation during hormone replacement therapy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 1, p. 1, 2016.

GONZÁLEZ, Alexander AP et al. O SIGNIFICADO DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS CUTÂNEOS NO DIAGNÓSTICO DO HIPOTIREOIDISMO EM CÃES, COM ÊNFASE NAS ALTERAÇÕES DOS MÚSCULOS PILOERETORES. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, 2013.

GOSSELIN, S. J. et al. Autoimmune lymphocytic thyroiditis in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 3, n. 1-2, p. 185-201, 1982.

GRAHAM, Peter A.; REFSAL, Kent R.; NACHREINER, Raymond F. Etiopathologic findings of canine hypothyroidism. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 37, n. 4, p. 617-631, 2007.

GRAHAM, Peter A., et al. "Lymphocytic thyroiditis." **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 31.5 (2001): 915-933.

GRECO, Deborah S. et al. Congenital hypothyroid dwarfism in a family of giant schnauzers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 57-65, 1991.

GROSS T.L. et al. **Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis**. 2 ed. Oxford: Blackwell Science, 2005.

GUYTON, Arthur Clifton; HALL, John E.; GUYTON, Arthur C. **Tratado de Fisiologia Médica**. Elsevier Brasil, 2006.

HAINES, D. M.; LORDING, P. M.; PENHALE, W. J. Survey of thyroglobulin autoantibodies in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 8, p. 1493-1497, 1984.

HARIA, Jigar; LUNIA, Manish. Sick euthyroid syndrome in chronic kidney disease. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 2, n. 43, p. 8267-8274, 2013.

HAUGEN, Bryan R. Drugs that suppress TSH or cause central hypothyroidism. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 793-800, 2009.

HEGSTAD-DAVIES, Rebecca L. et al. Breed-specific reference intervals for assessing thyroid function in seven dog breeds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 6, p. 716-727, 2015.

HESS, Rebecka S.; KASS, Philip H.; WINKLE, Thomas J. Association between diabetes mellitus, hypothyroidism or hyperadrenocorticism, and atherosclerosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 4, p. 489-494, 2003.

HOFER-INTEEWORN, Natalie et al. Effect of hypothyroidism on insulin sensitivity and glucose tolerance in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 4, p. 529-538, 2012.

IVERSEN, Lars et al. Biological variation of canine serum thyrotropin (TSH) concentration. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 28, n. 1, p. 16-19, 1999.

JO, Sungro et al. Neuronal hypoxia induces hsp40-mediated nuclear import of type 3 deiodinase as an adaptive mechanism to reduce cellular metabolism. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 25, p. 8491-8500, 2012.

JOSEPH-BRAVO, Patricia et al. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary–thyroid axis. **Journal of Endocrinology**, v. 226, n. 2, p. T85-T100, 2015.

KANTROWITZ, Lawrence B. et al. Serum total thyroxine, total triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations in dogs with nonthyroidal disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 6, p. 765-769, 2001.

KAPTEIN, ELAINE et al. Thyroxine metabolism in the low thyroxine state of critical nonthyroidal illnesses. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 53, n. 4, p. 764-771, 1981.

KAPTEIN, ELAINE M. et al. Effects of prednisone on thyroxine and 3, 5, 3'-triiodothyronine metabolism in normal dogs. **Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 1669-1679, 1992.

KAPTEIN, Elaine M.; HAYS, Marguerite T.; FERGUSON, Duncan C. Thyroid hormone metabolism: a comparative evaluation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 24, n. 3, p. 431-466, 1994.

KÖHRLE, Josef. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. **Molecular and CELLULAR ENDOCRINOLOGY**, v. 151, n. 1, p. 103-119, 1999.

KOOISTRA, H. S. et al. Secretion pattern of thyroid-stimulating hormone in dogs during euthyroidism and hypothyroidism. **Domestic animal endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 19-29, 2000.

KRZYŻEWSKA-MŁODAWSKA, Alicja; MAX, Andrzej; BARTYZEL, Bartłomiej J. Influence of gonadectomy on serum ft4 concentrations in male and female dogs. **Vet Med**, v. 17, n. 01, 2014.

LAFLAMME, D. Development and validation of a body condition score system for dogs. **A Clinical Tool**, v. 22, n. 4, p. 10-15, 1997.

LARSSON, Mats. Diagnostic methods in canine hypothyroidism and influence of nonthyroidal illness on thyroid hormones and thyroxine binding proteins. 1987.

LAVOUÉ, Rachel et al. Breed-specific biochemical reference intervals for the adult Dogue de Bordeaux. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 3, p. 346-359, 2013.

LECHAN, Ronald M. The dilemma of the nonthyroidal illness syndrome. **Acta bio-medica: Atenei Parmensis**, v. 79, n. 3, p. 165, 2008.

LEONI, S. G. et al. Differential gene expression analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCC13. **Genomics**, v. 91, n. 4, p. 356-366, 2008.

- LUCKE, Vanda M.; GASKELL, C. J.; WOTTON, P. R. Thyroid pathology in canine hypothyroidism. **Journal of Comparative Pathology**, v. 93, n. 3, p. 415-421, 1983.
- MAENHAUT, Carine et al. In vitro and in vivo regulation of thyrotropin receptor mRNA levels in dog and human thyroid cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 5, p. 3000-3007, 1992.
- MAIA, Ana Luiza et al. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 9, p. 2524, 2005.
- MARK, E. P.; PANCIERA, D. L.; BICHARD, S. J. Doenças Endócrinas Metabólicas. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Clínica de Pequenos Animais**, 3 ed. São Paulo: Roca Ltda, 2008, cap. 31, p. 331-335.
- MATAMOROS, Roberto; GOMEZ, C.; ANDAUR RADEMACHER, Marcela. Hormones of Diagnostic Value in Veterinary Medicine. 2012.
- MAZAKI-TOVI, Michal et al. Increased serum concentrations of adiponectin in canine hypothyroidism. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 2, p. 253-255, 2015.
- MCDONALD, Leslie Ernest. **Veterinary endocrinology and reproduction**. Veterinary endocrinology and reproduction. (1969).
- MEDICI, Marco et al. Genetic determination of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis: where do we stand?. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 2, p. 214-244, 2015.
- MEIATTINI, F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 24, n. 12, p. 2161-2165, 1978.
- MILLER, J.; POPIEL, J.; CHEŁMOŃSKA-SOYTA, A. Humoral and Cellular Immune Response in Canine Hypothyroidism. **Journal of Comparative Pathology**, v. 153, n. 1, p. 28-37, 2015.
- MOONEY, C. T. Canine hypothyroidism: a review of aetiology and diagnosis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 3, p. 105-114, 2011.
- MOONEY, C. T.; ANDERSON, T. J. Congenital hypothyroidism in a boxer dog. **Journal of SMALL ANIMAL PRACTICE**, v. 34, n. 1, p. 31-35, 1993.
- MÜNTENER, Tabitha et al. Canine noninflammatory alopecia: a comprehensive evaluation of common and distinguishing histological characteristics. **Veterinary DERMATOLOGY**, v. 23, n. 3, p. 206, 2012.
- OLIVARES, Emerson L. et al. Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats—a time course study. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4786-4792, 2007.
- PANCIERA, D. Developing a rational approach to diagnosing and treating canine hypothyroidism. 1997.

PANCIERA, D. L. 1998. Canine hypothyroidism. In: Manual of Small Animal Endocrinology. 2nd ed. Torrance, A.G., Mooney, C.T. (eds.). **British Small Animal Veterinary Association**, United Kingdom. pp. 103-113.

PANCIERA, D. L. et al. Reproductive effects of prolonged experimentally induced hypothyroidism in bitches. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 2, p. 326-333, 2012.

PANCIERA, D. L. Hypothyroidism in dogs: 66 cases (1987-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 5, p. 761-767, 1994.

PARRY, Nicola. Hypothyroidism in dogs: laboratory findings. **Companion Animal**, v. 18, n. 3, p. 101-105, 2013.

PEAKE, Michael; WHITING, Malcolm. Measurement of serum creatinine—current status and future goals. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 27, n. 4, p. 173, 2006.

PEIXOTO, P. V. et al. Considerations about the levels of iodine in the diet and the occurrence of hypothyroidism in dogs and humans in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria (Brazil)**, 2012.

PESSINA, P. et al. Physiological changes, in German shepherd, in metabolic and endocrine parameters most frequently used in the diagnosis of canine hypothyroidism. **Veterinaria (Montevideo)**, v. 50, n. 195, p. 4-16, 2014.

PETERSON, M. E.; MELIAN, C.; NICHOLS, R. Measurement of serum total thyroxine, triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations for diagnosis of hypothyroidism in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, n. 11, p. 1396-1402, 1997.

PIERCE, J. G. et al. Studies on the structure of thyrotropin: its relationship to luteinizing hormone. **Recent Progr. Hormone Res**, v. 27, p. 165, 2013.

RAFFAN, Eleanor et al. A deletion in the canine POMC gene is associated with weight and appetite in obesity-prone labrador retriever dogs. **Cell metabolism**, v. 23, n. 5, p. 893-900, 2016.

RANDOLPH, J. F. et al. Free thyroxine concentrations by equilibrium dialysis and chemiluminescent immunoassays in 13 hypothyroid dogs positive for thyroglobulin antibody. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 3, p. 877-881, 2015.

RASMUSSEN, Stephanie Haugaard; ANDERSEN, Helene Hjorth; KJELGAARD-HANSEN, Mads. Combined assessment of serum free and total T4 in a general clinical setting seemingly has limited potential in improving diagnostic accuracy of thyroid dysfunction in dogs and cats. **Veterinary clinical pathology**, v. 43, n. 1, p. 1-3, 2014.

REFSAL, K. R.; NACHREINER, R. F. Monitoring thyroid hormone replacement therapy. Kirk's Current Veterinary Therapy XII: **Small Animal Practice**. Eds Kirk, RW & Bonagura, JD, p. 364-368, 1995.

REIMERS, T. J. et al. Effects of age, sex, and body size on serum concentrations of thyroid and adrenocortical hormones in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 3, p. 454-457, 1990.

ROJKO, J. L.; HOOVER, E. A.; MARTIN, S. L. Histologic interpretation of cutaneous biopsies from dogs with dermatologic disorders. **Veterinary Pathology Online**, v. 15, n. 5, p. 579-589, 1978.

ROOVER, K. De et al. Effect of Storage of Reconstituted Recombinant Human Thyroid-Stimulating Hormone (rhTSH) on Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) Response Testing in Euthyroid Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 812-817, 2006.

ROSYCHUK, R. A. W. Dermatologic manifestations of canine hypothyroidism and the usefulness of dermatohistopathology in establishing a diagnosis. **Canine practice (Santa Barbara, Calif.: 1990)(USA)**, 1997.

RUDAS, P. et al. Impaired local deiodination of thyroxine to triiodothyronine in dogs with symmetrical truncal alopecia. **Veterinary research communications**, v. 18, n. 3, p. 175-182, 1994.

RUDAS, P.; RÓNAI, Zs; BARTHA, T. Thyroid hormone metabolism in the brain of domestic animals. **Domestic animal endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 88-96, 2005.

SAFER, Joshua D. Thyroid hormone action on skin. **Dermato-endocrinology** (2011): 211-215.

SALVATORE, Domenico. Deiodinases: keeping the thyroid hormone supply in balance. 2011.

SAUVE, Frederic; PARADIS, Manon. Use of recombinant human thyroid-stimulating hormone for thyrotropin stimulation test in euthyroid dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 41, n. 3, p. 215, 2000.

SCARLETT, Janet M. Epidemiology of thyroid diseases of dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 24, n. 3, p. 477-486, 1994.

SCHOENMAKERS, Christian HH; PIGMANS, Ingrid GAJ; VISSER, Theo J. Species differences in liver type I iodothyronine deiodinase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1121, n. 1, p. 160-166, 1992.

SCHRÖDER-VAN DER ELST, Janny P. et al. Iodothyronine deiodinase activities in fetal rat tissues at several levels of iodine deficiency: a role for the skin in 3, 5, 3'-triiodothyronine economy?. **Endocrinology**, v. 139, n. 5, p. 2229-2234, 1998.

SCOTT, D.; MILLER, W.; GRIFFIN, C. Muller. **KIRK'S Small animal dermatology**. WB Saunders, Philadelphia, PA, USA, p. 121-122, 2001.

SCOTT-MONCRIEFF, J. Catharine et al. Evaluation of antithyroglobulin antibodies after routine vaccination in pet and research dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 4, p. 515-521, 2002.

SCOTT-MONCRIEFF, J. Catharine. Clinical signs and concurrent diseases of hypothyroidism in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 37, n. 4, p. 709-722, 2007.

SCOTT-MONCRIEFF, J. Catharine. Thyroid disorders in the geriatric veterinary patient. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 707-725, 2012.

SCOTT-MONCRIEFF, J. Catharine. Thyroid disorders in the geriatric veterinary patient. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 707-725, 2012.

SEAVERS, A. et al. Evaluation of the thyroid status of Basenji dogs in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 86, n. 11, p. 429-434, 2008.

SERRANO-NASCIMENTO, Caroline et al. New insights about the posttranscriptional mechanisms triggered by iodide excess on sodium/iodide symporter (NIS) expression in PCC13 cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 349, n. 2, p. 154-161, 2012.

SHIEL, R. E. et al. Thyroid hormone concentrations in young, healthy, pretraining greyhounds. **The Veterinary Record**, v. 161, n. 18, p. 616-619, 2007.

SHIEL, Robert E. et al. Assessment of criteria used by veterinary practitioners to diagnose hypothyroidism in sighthounds and investigation of serum thyroid hormone concentrations in healthy Salukis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 3, p. 302-308, 2010.

SHIEL, Robert E. et al. Tertiary hypothyroidism in a dog. **Irish Veterinary Journal**, v. 60, n. 2, p. 88, 2007.

SHIWA, Tsuguka et al. Resistance to thyroid hormone accompanied by Graves' disease. **Internal Medicine**, v. 50, n. 18, p. 1977-1980, 2011.

SIMPSON, J. W.; VAN DEN BROEK, A. H. M. Fat absorption in dogs with diabetes mellitus or hypothyroidism. **Research in Veterinary Science**, v. 50, n. 3, p. 346-348, 1991.

SKOPEK, Evelyn; PATZL, Martina; NACHREINER, Raymond F. Detection of autoantibodies against thyroid peroxidase in serum samples of hypothyroid dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 5, p. 809-814, 2006.

SLOMINSKI, Andrzej et al. Expression of Hypothalamic–Pituitary–Thyroid Axis Related Genes in the Human Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 6, p. 1449-1455, 2002.

SMITHCORS, J. S. **Anatomy of the Dog**. WB Philadelphia, EUA: Saunders, 1964.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA CLÍNICA, COMITÉ CIENTÍFICO, COMISIÓN DE ENZIMAS. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la alanina aminotransferasa en suero sanguíneo humano. **Química Clínica**, v.6, p.241-244, 1987.

TAEYMANS, Olivier et al. Pre-and post-treatment ultrasonography in hypothyroid dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 48, n. 3, p. 262-269, 2007.

TALKE, H. S. G. E.; SCHUBERT, G. E. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. **Journal of Molecular Medicine**, v. 43, n. 3, p. 174-175, 1965.

TAYLOR, Elias; HEYLAND, Andreas. Evolution of thyroid hormone signaling in animals: Non-genomic and genomic modes of action. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2017.

THURÓCZY, Julianna et al. Thyroxin and progesterone concentrations in pregnant, nonpregnant bitches, and bitches during abortion. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1186-1191, 2016.

UYTTERSROT, Nathalie et al. Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 131, n. 2, p. 195-203, 1997.

VALA, Helena et al. Hormones and their Functions in the Dog. From the Cell to Hormone and from Hormone to Action. **Veterinary Medicine**, p. 165-189, 2013.

VAN DEN BERGHE, Greet. Dynamic neuroendocrine responses to critical illness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 23, n. 4, p. 370-391, 2002.

VAN GEFFEN, Cindy et al. Serum thyroid hormone concentrations and thyroglobulin autoantibodies in trained and non-trained healthy whippets. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 1, p. 135-140, 2006.

VARALLO, Giovanna Rossi et al. Estudo epidemiológico e achados laboratoriais de cães hipotireoideos atendidos no hospital veterinário “Dr. Halim Atique”, Rio Preto, SP, no período de janeiro de 2004 a fevereiro de 2010. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 15-21, 2014.

VOORBIJ, Annemarie MWY et al. Central Hypothyroidism in Miniature Schnauzers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 1, p. 85-91, 2016.

WALTON RM. **Establishing Reference Intervals: Health as a relative concept.** Sem Avian Exotic Pet Med. 2001;10: 66–71.

WARTOFSKY, Leonard; BURMAN, Kenneth D. Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the “euthyroid sick syndrome”. **Endocrine Reviews**, v. 3, n. 2, p. 164-217, 1982.

WEBER, J. A.; VAN ZANTEN, A. P. Interferences in current methods for measurements of creatinine. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 695-700, 1991.

WILLIAMS, Graham R.; BASSETT, JH Duncan. Local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase Deiodinases: the balance of thyroid hormone. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 3, p. 261-272, 2011.

WU; YIFEI; KOENIG, Ronald J. Gene regulation by thyroid hormone. **Trends in Endocrinology & Metabolism** 11.6 (2000): 207-211.

YEN, Paul M. et al. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 246, n. 1, p. 121-127, 2006.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no
Uso de Animais
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

NO USO DE ANIMAIS

(CEUA/UFRRJ)

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO STATUS FUNCIONAL DA GLÂNDULA TIREOIDE CORRELACIONADO COM O METABOLISMO EXTRATIROIDIANO EM CÃES.", protocolada sob o CEUA nº 3464210316, sob a responsabilidade de **Luis Carlos Reis e equipe; André de Souza Mecawi; Lio Moreira** - 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 - está 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, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 17/10/2016.

We certify that the proposal "Functional status assessment of the thyroid gland related to extrathyroid metabolism in dogs.", utilizing 15 Dogs (15 males), protocol number CEUA 3464210316, under the responsibility of **Luis Carlos Reis and team; André de Souza Mecawi; Lio Moreira** - 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as 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 Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 10/17/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2016** a **06/2016**

Área: **Clínica Médica**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 15 anos**

N: **15**

Linhagem: **Golden Retriever**

Peso: **20 a 40 kg**

Resumo: O hipotireoidismo é uma endocrinopatia de grande destaque na medicina canina. Este déficit na síntese e secreção de hormônios tireoidianos vem sendo apontado como a causa de inúmeros aspectos clínicos crônicos, especialmente cutâneos. Este fato é bastante preocupante, uma vez que a sintomatologia compatível com hipotireoidismo é bastante inespecífica, podendo estar presente em diversos outros distúrbios crônicos. Não obstante, é bem descrito na literatura que o nível dos hormônios tireoidianos tende a reduzir em concomitância com diversas outras doenças e/ou desafios terapêuticos, fazendo com que o paciente atravessasse um período transitório em que é chamado de eutireoide doente, ou seja, a glândula tireoide está preservada, todavia ocorre a redução dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos. Esta situação tem promovido há anos o hiperdiagnóstico falso positivo de hipotireoidismo na espécie, despertando o interesse científico com o intuito de explicar esta fase transitória e impedir a instituição de reposição hormonal inadequada. O presente trabalho visa correlacionar o status funcional da glândula tireoide com o metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos em cães.

Local do experimento: Policlínica Veterinária Escola da FMV

Seropédica, 04 de junho de 2017

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
portador (a) de RG n° _____,
CPF _____, telefones (____) _____;
(____) _____, e-mail: _____, médico
(a) veterinário (a) e responsável pelo (a) _____,
autorizo a utilização do espaço físico do estabelecimento supracitado para a execução do projeto de pesquisa de doutorado da aluna Renata Ribeiro Novais de Carvalho (CRMV-RJ 9355, telefone (21) 987-327-444, e-mail: novaisrr5@gmail.com) do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária sob orientação do Professor Luís Carlos Reis do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, aprovado pelo Comitê de ética na pesquisa sob o protocolo 3464210316.

Estou ciente que não serei gratificado monetariamente. Poderei receber maiores informações sobre esta pesquisa caso deseje, e também poderei esclarecer minhas dúvidas com a pesquisadora responsável durante toda a execução do estudo. Este contato pode ser realizado pessoalmente, por telefone ou e-mail.

Declaro que fui informado (a), de forma clara e objetiva, sobre todos os procedimentos da pesquisa e que estou participando por livre escolha.

_____, / /2016,

Concedente

Renata Ribeiro Novais de Carvalho
Solicitante

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, portador de RG nº _____, CPF _____ telefones (____) _____; (____) _____, e-mail: _____ residente na _____, responsável pelo animal denominado _____, espécie canina, raça Golden Retriever, idade _____ sexo masculino, autorizo a utilização do animal supracitado, sob o número de registro _____ para pesquisa de fins didáticos e científicos no estudo da aluna de doutorado da UFRRJ, médica veterinária Renata Ribeiro Novais de Carvalho, CRMV-RJ 9355, telefone (21) 987-327-444, e-mail: novaisrr5@gmail.com

Comprometo-me, gentilmente, a fornecer os dados referentes ao meu animal, bem como quaisquer informações questionadas pelos médicos veterinários da equipe científica durante todo o estudo. Este contato pode ser feito pessoalmente, por telefone ou *e-mail*.

Após esclarecimentos prévios, estou ciente da submissão do animal à coleta de material biológico, inclusive por procedimento cirúrgico (biópsia de pele), captura de imagens diagnósticas do paciente, medições zootécnicas, assim como a utilização de resultados de pesquisa obtidos pelo estudo no animal em publicação de artigos científicos e divulgação em eventos científicos.

Para fins de publicações e apresentações científicas, estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Estou ciente que não serei gratificado monetariamente. Meus benefícios pela participação na pesquisa atem-se à gratuidade dos exames realizados, bem como a notificação dos resultados obtidos (estes sem data limite para obtenção) sobre os quais poderei ser beneficiado com a prescrição necessária para meu animal.

Estou ciente que a qualquer momento poderei suspender a participação do animal na pesquisa e que, caso isso ocorra, o animal não sofrerá prejuízos em seu tratamento ou retorno a esta Instituição. Em caso de desistência, comprometo-me a notificar a equipe científica com antecedência de, no mínimo, 15 dias e estou ciente de que, diante desta escolha não terei acesso aos resultados de exames gratuitamente realizados em meu animal.

Poderei receber maiores informações sobre esta pesquisa caso deseje, e também poderei esclarecer minhas dúvidas com a pesquisadora responsável durante toda a execução do estudo. Este contato pode ser pessoalmente, por telefone ou *e-mail*.

Fui informado dos riscos da utilização do animal para fins didáticos e/ou científicos e estou ciente que, na ocorrência de danos decorridos **durante** o procedimento de coleta de material biológico, cirurgias, captura de imagens diagnósticas e demais procedimentos para a pesquisa em questão, o animal poderá ser atendido sem ônus para mim por profissionais da Policlínica Veterinária Escola da FMVV.

Concordo em seguir corretamente todas as recomendações dos profissionais da equipe científica durante e após a utilização do animal, como administração de medicamentos e manutenção do colar Elizabetano até a retirada de pontos e, caso haja qualquer dano ao animal referente ao **não cumprimento dessas recomendações**, não responsabilizarei a Policlínica Veterinária Escola, bem como a equipe científica.

Declaro que fui informado (a), de forma clara e objetiva, sobre todos os procedimentos da pesquisa e que estou participando por livre escolha.

_____, / /2016,

Renata Ribeiro Novais de Carvalho
CRMV-RJ 9355
Doutoranda PPGMV UFRRJ

Assinatura do Responsável pelo animal

**ANEXO D – ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL ADAPTADO DE
LAFLAMME (1997)**

Condição	Escore	Características
Subalimentado	1	Costelas, vértebras lombares, ossos pélvicos e todas as saliências ósseas visíveis à distância. Não há gordura corporal discernível. Perda evidente de massa muscular
	2	Costelas, vértebras lombares e ossos pélvicos facilmente visíveis. Não há gordura palpável. Algumas outras saliências ósseas podem estar visíveis. Perda mínima de massa muscular.
	3	Costelas facilmente palpáveis podem estar visíveis sem gordura palpável. Visível o topo das vértebras lombares. Os ossos pélvicos começam a ficar visíveis. Cintura e reentrância abdominal evidentes.
Ideal	4	Costelas facilmente palpáveis com mínima cobertura de gordura. Vista de cima, a cintura é facilmente observada. Reentrância abdominal evidente.
	5	Costelas palpáveis sem excessiva cobertura de gordura. Abdome retraído quando visto de lado.
	6	Costelas palpáveis com leve excesso de cobertura de gordura. A cintura é visível quando vista de cima, mas não é acentuada. Reentrância abdominal aparente.
Sobrealimentado	7	Costelas palpáveis com dificuldade; intensa cobertura de gordura. Depósitos de gordura evidentes sobre a área lombar e base da cauda. Ausência de cintura ou apenas visível. A reentrância abdominal pode estar presente.
	8	Impossível palpar as costelas situadas sob cobertura de gordura muito densa ou costelas palpáveis somente com pressão acentuada. Pesados depósitos de gordura sobre a área lombar e base da cauda. Cintura inexistente. Não há reentrância abdominal. Poderá existir distensão abdominal evidente.
	9	Maciços depósitos de gordura sobre o tórax, espinha e base da cauda. Depósitos de gordura no pescoço e membros. Distensão abdominal evidente.

ANEXO E – SINAIS CLÍNICOS

Animal	Escore corporal	Sedentarismo	Cansaço/letargia	Dermatopatias	Neuropatias
1	7	Não	Não	Leucotriquia	
2	9	Não	Sim	Seborreia/leucotriquia/ <i>facies tragica</i>	
3	9	Não	Sim		
4	7	Não	Não		Convulsões
5	7	Sim	Não	Alergia/piodermite	
6	7	Sim	Não	Leucotriquia	Agressividade
7	9	Sim	Sim		
8	5	Não	Não	Alergia/piodermite/mucínose	
9	5	Não	Não	Leucotriquia	
10	5	Não	Não	Alergia/piodermite/leucotriquia	
11	5	Não	Não	Alergia/piodermite	Agressividade
12	7	Não	Não	Mastocitoma	
13	7	Não	Sim	Leucotriquia	Agressividade
14	9	Não	Sim	Piodermite	
15	5	Não	Não	Mucínose	
16	7	Sim	Não	Seborreia/leucotriquia	
17	7	Não	Sim	Seborreia/leucotriquia	
18	7	Sim	Sim	Piodermite	
19	9	Sim	Sim	Malasseziose	
20	9	Sim	Sim	Malasseziose/Piodermite	
21	7	Não	Sim	Leucotriquia/Piodermite	

ANEXO F – CONCENTRAÇÃO DE IODO NA DIETA

Animal	Escore corporal
1	3,00mg (900µg iodo/dia)
2	1,60mg (480µg iodo/dia)
3	1,60mg (480µg iodo/dia)
4	0,83mg (249µg iodo/dia)
5	1,60mg (480µg iodo/dia)
6	3,00mg (900µg iodo/dia)
7	1,28mg (300µg iodo/dia)
8	2,20mg (660µg iodo/dia)
9	1,83mg (549µg iodo/dia)
10	1,28mg (300µg iodo/dia)
11	3,00mg (900µg iodo/dia)
12	3,00mg (900µg iodo/dia)
13	1,60mg (480µg iodo/dia)
14	2,70mg (810µg iodo/dia)
15	3,00mg (900µg iodo/dia)
16	2,20mg (660µg iodo/dia)
17	2,70mg (810µg iodo/dia)
18	1,28mg (300µg iodo/dia)
19	1,28mg (300µg iodo/dia)
20	1,28mg (300µg iodo/dia)
21	2,70mg (810µg iodo/dia)

ANEXO G – PARÂMETROS LABORATORIAIS BIOQUÍMICOS

Animal	ALT (10-88U/L)	AST (10-88U/L)	Triglicerídeos (20,0-112,0mg/dL)	Colesterol (135-270mg/dL)	Creatinina (0,5-1,5mg/dL)	Ureia (15-40mg/dL)
1	77	35	85	188	0,88	33
2	87	23	40	309	1,06	38
3	65	43	214	356	0,87	25
4	49	24	46	313	1,03	33
5	37	38	49	260	1,14	46 ↑
6	37	29	52	161	0,98	23
7	59	26	54	203	0,94	23
8	36	27	43	159	0,99	22
9	51	34	40	248	1,35	34
10	85	43	78	200	1,34	28
11	45	34	57	151	1,14	22
12	46	25	60	206	1,02	29

ANEXO H – PARÂMETROS LABORATORIAIS HISTOLÓGICOS - EPIDERME

Animal	Atrofia	Acantose	Hiperq. (S/F)	Exocitose	Espongiose	Hipergranulose	Hiperpigmentação	Epidermite
1	P	A	A	A	A	A	P	A
2	P	A	A	A	A	A	A	A
3	P	A	A	A	A	A	A	A
4	P	A	A	A	A	A	A	A
5	P	A	A	A	P	A	A	A
6	P	A	F	A	A	A	A	A
7	P	A	F	A	A	A	A	A
8	P	A	A	A	A	A	A	A
9	P	A	A	A	A	A	A	A
10	P	A	A	A	A	A	A	A
11	P	A	F	A	A	A	A	A
12	P	A	A	A	A	A	A	A

P: Presente; A: Ausente; S: Superficial; F: Folicular

ANEXO I – PARÂMETROS LABORATORIAIS HISTOLÓGICOS - DERME

Derme												
Animal	Atr. dérmica	Incont. Pig.	Esparsamento das fibras de colágeno	Fase folicular	Folículos em “chama”	Gl. Sud.	Gl. Sebácea	Hip.MPE	Vacuol. MPE	Infl. (Loc)	Infl. (tipo cel.)	Infl. (int.)
1	A	A	P	An	A	E	N	A	P	A	A	A
2	A	A	P	T	P	E	N	A	A	A	A	A
3	A	A	P	T	P	E	N	P/Leve	P	A	A	A
4	A	A	P	T	A	N	N	A	P	A	A	A
5	A	A	P	An	A	E	N	A	A	A	A	A
6	A	A	P	T	P	E	N	A	P	A	A	A
7	A	A	P	T	P	E	N	P/Leve	P	A	A	A
8	A	A	P	C	A	E	N	A	A	A	A	A
9	A	A	P	T	P	E	N	A	A	A	A	A
10	A	A	P	T	P	E	N	A	A	A	A	A
11	A	A	P	T	P	E	N	P/Leve	P	A	A	A
12	A	A	P	T	P	N	N	A	A	A	A	A

P: Presente; A: Ausente; An: Anagênica; C: Catagênica; T: Telogênica; E: Ectasia; N: Normal

ANEXO J – RESULTADOS HORMONAIS

Animal	T4 LD	TSH	T4t pré TSH	T4t pós TSH
	(0,30 – 2,5ng/dL) Hegstad-Davies <i>et al.</i> 2015	(0,03 – 0,32ng/ml) Hegstad-Davies <i>et al.</i> 2015	0,40 – 3,30 µg/dL (nmol/L) Hegstad-Davies <i>et al.</i> 2015	≥2,5 e 1,5x pré (nmol/L) Boretti <i>et al.</i> 2009
1	0,68	0,22	1,80 (22,86)	3,94 (50,03)
2	0,60	0,58	1,69 (21,46)	4,31 (54,73)
3	0,49	0,33	1,38 (17,52)	4,55 (57,78)
4	0,57	0,28	1,29 (16,38)	3,20 (40,64)
5	0,48	0,46	1,16 (14,73)	2,79 (35,43)
6	0,52	0,21	2,35 (29,84)	5,60 (71,11)
7	0,46	0,29	1,22 (15,49)	4,00 (50,80)
8	0,70	0,15	2,61 (33,14)	6,39 (81,15)
9	1,07	0,21	3,02 (38,35)	5,85 (74,29)
10	1,63	0,19	1,81 (22,98)	3,63 (46,10)
11	0,44	0,17	1,18 (14,98)	4,09 (51,94)
12	0,57	0,20	1,90 (24,13)	3,81 (48,38)
13	1,10	0,12	-	-
14	1,20	0,04	-	-
15	1,19	0,15	-	-
16	1,02	0,15	-	-
17	0,90	0,12	-	-
18	1,33	0,08	-	-
19	1,01	0,09	-	-
20	1,03	0,10	-	-
21	0,90	0,04	-	-