

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

DISSERTAÇÃO

**RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS A DIFERENTES INTENSIDADES  
DE TRABALHO EM CÃES DE POLICIAMENTO MANTIDOS EM  
ISOLAMENTO SOCIAL E RESTRIÇÃO ESPACIAL**

CARLA MYRRHA CHAVES DUQUE

2013



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

RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS A DIFERENTES INTENSIDADES DE  
TRABALHO EM CÃES DE POLICIAMENTO MANTIDOS EM  
ISOLAMENTO SOCIAL E RESTRIÇÃO ESPACIAL

CARLA MYRRHA CHAVES DUQUE

*Sob a orientação do Professor*  
**Dr. Emerson Lopes Olivares**

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

Seropédica-RJ

Julho 2013

636.70896

Duque, Carla Myrrha Chaves, 1987-

D946r

T

Respostas neuroendócrinas a diferentes intensidades de trabalho em cães de policiamento mantidos em isolamento social e restrição espacial / Carla Myrrha Chaves Duque. - 2013.

77 f.: il.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2013.

Bibliografia: f. 60-65.

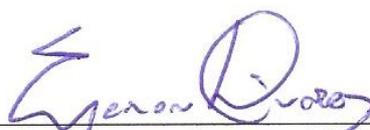
1. Cão policial - Efeito do stress - Teses. 2. Cão policial - Doenças - Teses. 3. Cão de trabalho - Teses. 4. Hipotireoidismo - Teses. 5. Medicina veterinária - Teses. I. Olivares, Emerson Lopes, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

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

**CARLA MYRRHA CHAVES DUQUE**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/07/2013



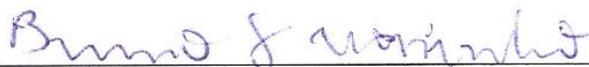
---

Emerson Lopes Olivares (Ph. D) UFRRJ  
(orientador)



---

Rita Leal Paixão (Ph. D) UFF



---

Bruno Guimarães Marinho (Ph. D) UFRRJ

## **DEDICATÓRIA**

À minha Família, que sempre fez e continua fazendo tudo por mim. Sem vocês eu não seria ninguém, vocês são o meu céu e o meu chão.

*Amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Emerson Lopes Olivares, por ter me acolhido e apoiado nessa jornada. Por me incentivar, por retirar minhas dúvidas e me por tantas outras, por buscarmos resposta juntos, por querer sempre mais e melhor, por me compreender, por ser paciente, por estar sempre presente quando precisei, por puxar minha orelha quando necessário, por respeitar minhas escolhas, por discutir sempre e não se impor nunca.

Obrigado pela companhia e aprendizado, mas principalmente por ter se tornado um exemplo a ser seguido em todos os aspectos.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, com os quais tive o prazer de cursar as disciplinas, por todos os ensinamentos e conselhos dados de forma generosa e sincera e por contribuírem de forma significativa para minha formação.

Aos Professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, por todas as críticas e sugestões e por simplesmente me permitirem observar e participar de suas discussões, não sei quantificar o quanto isso me fez crescer.

Aos Amigos que fiz, tanto no Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária quanto no Departamento de Ciências Fisiológicas, vocês não imaginam como foram importantes, trocando conhecimento e ideias, ou apenas conversa fora e muitas risadas. Em especial à Amanda, Julia, Nanaty, Lu, Raquel, Renatinha, Anderson, Claudinho e Nati.

As funcionárias Regina e Lorena por estarem sempre dispostas e atentas aos nossos problemas e necessidades.

Ao Instituto de Biologia do Exército/ IBEx na figura do Diretor Cel. Lúcio Aparecido Luíz, por todo apoio técnico-científico através da Divisão de Ensino e Pesquisa/ DEP, pelo apoio ao projeto na realização de todas as avaliações laboratoriais. Se tornando um incentivador a pesquisa.

À Divisão de Hormônios do IBEx na figura do Cap Leandro Durte Pereira e o Ten Timberg Faria, pela realização de todas as avaliações hormonais.

À Divisão de Bioquímica do IBEx na figura do Maj Claudio de Andrade e o Sgt Hércules Ferreira da Silva, pela realização das dosagens de colesterol.

À Divisão de Hematologia do IBEx na figura do Cap Alessandro Carino, pela realização do hemogramas.

Ao Campo de Instrução de Gericinó/ CIG na figura de seu Comandante Cel Marcus Couto, por permitir e apoiar a realização deste experimento com os seus cães da Seção de Cães de Guerra.

À Cap Rita, Médica Veterinária do CIG, não só por seu apoio e interesse, mas por ter abraçado e participado intensamente deste experimento, sua coordenação durante as avaliações foi essencial. Foi um aprendizado o tempo que passamos juntas, por isso toda minha admiração e respeito.

À Ten Paula, Médica Veterinária do CIG, por todo seu interesse, tempo e compreensão, despendido neste experimento.

À Escola de Equitação do Exército/ EsEqEx na figura de seu Comandante, Cel Ataíde Barcelos Pereira, por permitir e apoiar a realização deste experimento com os seus cães da Seção de Cães de Guerra.

À Ten Vânia, Médica Veterinária da EsEqEx, por seu apoio, interesse e ajuda na realização deste experimento. É muito importante poder contar não só com a ajuda efetiva, mas principalmente com o interesse sincero e gratuito.

Aos indispensáveis Cabos e Soldados do GIG e EsEqEx. CIG: Cb Serapião, Sd Eduardo, Sd Gentiluce, Sd Ângelo; Sd S. Rodrigues, Sd Rafael, Sd Anderson, Sd Rodolfo e Sd Wellington. ESEQEx : Sd. Rodrigo, Sd. Lima, Sd. Campos, Sd. Patrick. Sem a ajuda de vocês certamente este trabalho não teria acontecido, vocês foram a força que fizeram a máquina funcionar. Obrigado pelo trabalho que tiveram em por animais para trabalhar, em ajudar nas coletas, por terem feito força de verdade, por aguentarem as mordidas, mas principalmente terem se interessado de forma sincera, quererem fazer dar certo e fizeram, por todas as perguntas interessadas “o que é que você vai estudar no sangue deles?” e também as engraçadas “esse negocinho é pra que, hein?” (aparelho de glicose), por excesso de jeito e as vezes falta dele, pelo empenho, por todas as risadas e brincadeiras, vocês tornaram este estudo muito divertido. Foram momentos que eu vou lembrar com carinho para sempre. Não tenho palavras para expressar minha gratidão. Vocês foram incríveis.

Aos Cães Zinke, Aloha, Astor, Ava, Bell, Hórus, Bruta, Brutos, Ata, Apolo, Shanna, VanDame, Índio, Úrsula e Uly o meu agradecimento mais especial, sem vocês este trabalho não existiria, para vocês toda gratidão, carinho e respeito. Vocês não foram só animais de um experimento, vocês foram indivíduos com personalidade e peculiaridades, que eu aprendi a reconhecer, demonstraram que apesar de serem animais de trabalho, são cães como os o que temos em casa, com seu carinho e afeição pelo condutor, são bravos, as vezes dóceis, obedientes, carinhosos, brincalhões. Vocês não me deixaram esquecer o porquê de ter escolhido minha profissão, eu amo estar perto de vocês, nem que seja só para olhar. Espero que este estudo contribua para uma melhor qualidade de vida dos cães de trabalho, se possível, respeitando suas aplicabilidades. Foi muito bom ver que vocês são tratados com muito cuidado, carinho e respeito.

As agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPERJ.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu namorado Marcelo Henriques e também Ten Cel Henriques, Médico Veterinário do IBEx, por simplesmente tudo. Você foi fundamental para realização deste trabalho. Por todo apoio técnico, por todos os contatos e apresentações, por todas as sugestões e críticas, por me dizer sempre que “o sucesso é 10% inspiração e 90% transpiração”, por todas as vezes que me levou e me buscou nos quartéis para realizar os experimentos, por todas as vezes que ficou no IBEx depois do expediente para me esperar centrifugar e processar o sangue, por ter acompanhado de perto cada etapa, por me incentivar sempre, por dar boas ideias, por me fazer milhões de favores e principalmente por todo apoio emocional, por todo carinho, atenção, amor, compreensão, por me aturar de mau humor, por me levar à praia todos os fins semana, por me levar ao cinema todas as semanas, por me levar aos meus restaurante favoritos, por compartilhar dos meus gostos, por aturar minhas manias, por todos os livros que compramos juntos, por me fazer rir todos dias, por ser sempre presente, por me dar um beijo todos dias ao sair e ao voltar para casa, por compartilhar sua vida comigo e por fazer mais que o possível para me fazer feliz, eu reconheço. Obrigado pelos melhores cinco anos da minha vida.

Aos meus pais Vania e Carlos Magno, pelo amor incondicional que sempre me deram, por respeitarem e apoiarem sempre minhas escolhas, por todo apoio emocional e financeiro, não há nada melhor do que saber que posso contar sempre com vocês em todos os sentidos, obrigado por terem feito de mim quem eu sou hoje, por terem me preparado para vida em vez de me esconderem dela, isso foi fundamental, por me darem muito mais do era preciso, por confiarem em mim e por terem me feito feliz nesses 26 anos.

Aos meus avós Eni e Sylvio, por todo carinho e mimos que sempre me fizeram, a minha vó por me deixar brincar de comidinha de verdade, com farinha, fubá, arroz, alho e muita bagunça, ao meu avô pelo exemplo de homem que foi, a pessoa que eu mais admirei na vida. Sinto que vocês que tenha partido tão cedo, mas deixaram as melhores lembranças.

Aos meus queridos tios e tias Estela, Sergio, Ângela, Paulinho e Sônia, por todo amor e carinho, por serem presentes, por me incentivarem e me cobrarem sempre e por serem tão presentes quanto os meus pais.

À minha Tia Eliane um agradecimento especial, além de ser minha madrinha, foi sempre minha segunda mãe, não consigo me lembrar de nenhuma fase da vida em que ela não estivesse intensamente presente, obrigada pelas viagens, pelos passeios, pelos infinitos presentes que me dá até hoje, pelo amor, pelo carinho, por tudo que me ensinou, por me deixar fazer tudo que eu não deveria fazer e por me ensinar que o bom humor é a melhor coisa da vida, que mesmo o que dá errado pode ser engraçado. Eu nunca vou conseguir retribuir tudo que faz por mim.

Aos meus queridos primos Carolina, Lilian, Maria Leopoldina, Larissa e André, vocês são muito preciosos, faria tudo por vocês.

Aos meus bichinhos, Mel a gatinha mais dengosa do mundo obrigada por se aninhar comigo por me dar seu carinho e deixar que eu te de o meu, Adara, a cachorra mais gostosa do mundo, apesar de pesar mais do eu, adoro quando sobe no meu colo, mesmo quase me esmagando, você é meu ursão que eu posso apertar e espremer sem medo de machucar, as vezes me falta força para tanto tamanho, Nina, o amor da mamãe, a York mais linda do mundo, não só por fora, mas por dentro, nunca vi tanta dedicação, amor e disposição em um cãozinho, acho que nos damos tão bem por sermos idênticas, agitadas demais, impacientes demais, alegres demais e pentelhas demais. Minha mãe sempre diz “eu não sei se é a cachorra que te agita ou é você que agita a cachorra” acho que as duas coisas. Obrigado por vocês existirem e me permitirem ama-las, vocês são minha maior alegria.

Um agradecimento e uma homenagem especial a minha avó Judith (Vó Pipoca), certamente um exemplo a ser seguido, não consigo expressar minha admiração e meu agradecimento por tudo que ela foi para mim e para minha família, ela era cola que nos mantinha unidos e era uma cola tão boa que mesmo agora que ela se foi, nós continuamos unidos, foi o maior bem que ela nos deixou, nos ensinou como ser uma família de verdade. Ela acompanhou o início dessa minha jornada, se interessava, e não se contentava quando eu dizia que estava estudando a fisiologia dos cães de trabalho, ela queria saber como? e porque?, queria saber quais hormônios e o que eles faziam e depois que eu explicava tudo minuciosamente ela dizia “a ciência hoje é uma coisa fabulosa, existem muitos recursos, eles descobrem tudo” só não descobriram como deixar você mais tempo com a gente. Mas já valeu os nossos 25 anos de convívio e seus 90 de vida. Valeu tudo que me ensinou, e foram muitas coisas, tudo que vivemos e tudo que compartilhamos. Tudo que eu tenho hoje começou em você, sei que temos muitos defeitos, mas somos uns para outros a melhor família do mundo e é isso que importa. Muitas saudades, mas quero me lembrar sempre, mesmo que doa.

## RESUMO

DUQUE, Carla Myrrha Chaves. **Respostas Neuroendócrinas a Diferentes Intensidades de Trabalho em Cães de Policiamento Mantidos em Isolamento Social e Restrição Espacial.** 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Desde que foi estabelecida a relação entre o estresse e a saúde física e mental, os estudos sobre seus mecanismos e efeitos nos indivíduos tornaram-se mais frequentes. O estresse deixou de ser uma condição exclusivamente humana e tem se tornado importante também para animais seja visando qualidade de vida ou o desempenho, no caso dos animais de trabalho. Sabe-se que a restrição espacial, o isolamento social e o trabalho podem ser estímulos potencialmente estressores em cães. A fim de caracterizar as manifestações de estresse durante diferentes intensidades de trabalho e a influência do isolamento social/restrrição espacial (ISRE) sobre diferentes eixos neuroendócrinos neste contexto, foram avaliados 15 cães de policiamento em condições basais (T0) e imediatamente após (T1) e 30 min após (T2) os paradigmas de ataque e proteção (AP) ou adestramento básico (AB). Foram coletadas amostras de sangue nos tempos: Basal, T1 e T2 para as dosagens de cortisol, tiroxina (T4) e T3. Na avaliação do eixo HHA, o nível de cortisol basal encontrou-se dentro dos valores de normalidade para a espécie. Durante a exposição aos paradigmas, o mesmo apresentou elevações para duas atividades de forma distinta, pois embora sua elevação tenha sido tardia no AP em relação ao AB ela se mostrou mais intensa. Já na avaliação do eixo HHT, os níveis hormonais se mostraram bastante alterados, caracterizando o hipotireoidismo primário nesses animais. Quando o eixo foi avaliado diante dos paradigmas só o T3 se mostrou responsivo, onde seus níveis foram diminuídos durante o paradigma de AP. Os resultados sugerem que embora os animais pareçam adaptados ao estresse, apresentando níveis normais de cortisol, a presença do hipotireoidismo indica uma possível consequência do mesmo cronicamente. As diferentes atividades de trabalho realizadas induzem agudamente a diferentes respostas do eixo HHA e do eixo HHT.

**Palavras chave:** Estresse; Hipotireoidismo; Cães

## ABSTRACT

DUQUE, Carla Myrrha Chaves. **Neuroendocrine Responses to Different Intensities of Work in Military Dogs Maintained on Social Isolation and Spatial Restriction.** 2013 Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Since it was established the relationship between stress and physical and mental health, studies on its mechanisms and effects on individuals have become more frequent. Stress no longer an exclusively human condition and have become important for animals in to improve quality of life and performance in the case of working animals. It is known that the spatial restriction, social isolation and the work can be potentially stressful stimuli in dogs. In order to characterize the manifestations of stress during different intensities of work and influence of social isolation / spatial restriction (ISRE) on different neuroendocrine axes in this context, we evaluated 15 dogs policing at baseline (T0) and immediately after (T1) and 30 min after (T2) the paradigms of attack and protection (AP) or basic training (AB). Blood samples were collected at: Baseline, T1 and T2 for evaluation of serum levels of cortisol, thyroxine (T4) and T3. In order to access HPA axis, the baseline cortisol level was within the normal range for the species. Cortisol increased during exposure to both work paradigms, but although delayed, it was higher in AP compared to AB.. In spite of HPT axis, it was observed primary hypothyroidism in these animals. In the work paradigms, only T3 has changed, showing reduction during the AP paradigm. The results suggest that although the animals seem adapted to stress, presenting normal levels of cortisol, hypothyroidism indicates the presence of a possible chronic consequence. The different work activities performed acutely induce different responses of the HPA axis and the HPT axis.

**Keywords:** Stress; Hypothyroidism; Dogs

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1:** Cão em treinamento de ataque e proteção

**Figura 2:** Cão em treinamento de ataque e proteção

**Figura 3:** Cão em treinamento de ataque e proteção

**Figura 4:** Cão em treinamento de adestramento básico

**Figura 5:** Cão em treinamento de adestramento básico

**Figura 6:** Cão em treinamento de adestramento básico

**Figura 7:** Níveis de cortisol basal de todos os cães

**Figura 8:** Níveis de cortisol basal dos machos

**Figura 9:** Níveis de cortisol basal das fêmeas

**Figura 10:** Níveis de TSH basal de todos os cães

**Figura 11:** Níveis de TSH basal dos machos

**Figura 12:** Níveis de TSH basal das fêmeas

**Figura 13:** Níveis de  $T_3$  basal de todos os cães

**Figura 14:** Níveis de  $T_3$  basal de todos dos machos

**Figura 15:** Níveis de  $T_3$  basal de todos das fêmeas

**Figura 16:** Níveis de  $T_4$  basal de todos os cães

**Figura 17:** Níveis de  $T_4$  basal de todos dos machos

**Figura 18:** Níveis de  $T_4$  basal de todos das fêmeas

**Figura 19:** Níveis de glicose basal de todos os cães, machos e fêmeas

**Figura 20:** Níveis de lactato basal de todos os cães, machos e fêmeas

**Figura 21:** Níveis de colesterol basal de todos os cães, machos e fêmeas

**Figura 22:** Níveis de cortisol de todos os cães durante atividade de AP e AB

**Figura 23:** Níveis de glicose de todos os cães durante atividade de AP e AB

**Figura 24:** Níveis de lactato de todos os cães durante atividade de AP e AB

**Figura 25:** Níveis de TSH de todos os cães durante atividade de AP e AB

**Figura 26:** Níveis de  $T_4$  de todos os cães durante atividade de AP e AB

**Figura 27:** Níveis de  $T_3$  de todos os cães durante atividade de AP e AB

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1 Estresse	2
2.1.1 Alostase e carga alostática	4
2.1.2 Estresse em cães	4
2.1.2.1 Isolamento social, restrição espacial, trabalho e cães	5
2.1.2.2 Alterações comportamentais em resposta ao estresse em cães	5
2.1.2.3 Alterações hormonais em resposta ao estresse	6
2.1.2.3.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal na resposta ao estresse	6
2.1.2.3.1.1 Ciclo Circadiano	8
2.1.2.3.1.2 Relação do cortisol com glicose	9
2.1.2.4 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireoide em resposta ao estresse	9
2.1.2.4.1 Hipotireoidismo Canino	11
2.1.2.4.1.1 Relação entre o Hipotireoidismo e o Colesterol	12
2.1.2.4.1.2 Relação entre o Hipotireoidismo e o Lactato	13
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
3.1 Objetivos Gerais	14
3.2 Objetivos Específicos	14
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
4.1 Animais	15
4.2 Condição Clínica	15
4.3 Exames Laboratoriais	16
4.3.1 Avaliação Hormonal	16
4.3.2 Dosagem do colesterol	17
4.3.3 Dosagem do lactato e glicose	17
4.4 Protocolo Experimental	17
4.4.1 Primeira Fase	17

4.4.2 Segunda Fase	18
4.4.3 Terceira Fase	20
<b>5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b>	<b>23</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
6.1 Avaliação Basal	23
6.1.1 Cortisol	23
6.1.2 Eixo HHT	25
6.1.3 Glicose	32
6.1.4 Lactato	33
6.1.5 Colesterol	34
6.2 Avaliação em atividade comparativa entre os grupos AP e AB	34
6.2.1 Cortisol	35
6.2.2 Glicose	36
6.2.3 Lactato	36
6.2.4 Eixo HHT	37
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>59</b>
<b>9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O estresse vem recebendo grande enfoque nas últimas décadas, como sendo importante precursor de diversas patologias, por alterar diretamente a homeostase. As manifestações de estresse ocorrem de diversas maneiras, sejam elas alterações comportamentais ou fisiológicas. Indivíduos submetidos a situações estressantes rotineiramente, desenvolvem o estresse crônico, com efeitos ainda mais deletérios ao organismo.

O estresse e o bem-estar deixaram de ser uma preocupação limitada ao homem e passaram a ser também de extrema importância para os animais, sejam eles, silvestres, de produção, de estimação ou de trabalho. Saber reconhecer os sinais de estresse nos animais vem se mostrando um desafio para os pesquisadores. Diferentes espécies manifestam o estresse de maneiras diferentes, saber reconhecê-las e criar padrões de avaliação vem sendo buscado cada vez mais. As avaliações devem incluir observação comportamental e fisiológica. Alterações comportamentais devem ser observadas com atenção, pois embora pareçam subjetivas, comparando diversos estudos conseguimos distinguir comportamentos padrões durante o período de estresse, o que sugere também que as mesmas devem ser levadas em consideração. Já os parâmetros fisiológicos parecem ser mais fidedignos. Embora não tão bem esclarecidas, as vias neuroendócrinas em resposta ao estresse, caracterizadas pelas dosagens de hormônios circulantes, podem ajudar a diagnosticar e quantificar o nível dos mesmos. Provavelmente, correlacionar ambas (respostas comportamentais e neuroendócrinas) pode levar a resultados ainda mais fidedignos.

Diversas situações em que os animais são submetidos podem levar ao estresse, entre elas estão bem descritas o isolamento social seja em relação a outros animais ou ao ser humano e a restrição espacial, ou seja, ambientes pequenos e pouco enriquecidos. Esses dois fatores possivelmente indutores de estresse são observados no cotidiano de cães de policiamento do Exército Brasileiro, os quais vivem em canis isolados e só saem para o trabalho e treinamento. Neste contexto, o próprio trabalho também poder ser um possível indutor de estresse.

A avaliação desses cães para diagnosticar o estresse, bem como o nível deste, é importante para que procedimentos sejam adotados visando um maior bem-estar e qualidade de vida associados à melhora de desempenho, prevenindo assim futuras enfermidades

decorrentes do desequilíbrio da homeostase. Por fim, a caracterização do dimorfismo sexual nas respostas neuroendócrinas a diferentes intensidades de trabalho deve também ser útil para a melhor seleção dos animais a tarefas específicas. Do ponto de vista da Fisiologia, este estudo tem grande importância no sentido de acrescentar informações clínico-laboratoriais relevantes para o maior entendimento das respostas ao estresse, bem como, das relações entre eixos neuro-endócrinos distintos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Estresse**

A vida existe devido à manutenção da homeostase, constantemente desafiada por forças adversas intrínsecas e extrínsecas e o organismo reage a essas forças por meio de ajustes vegetativos e respostas comportamentais. O conceito de meio interno foi definido por Claude Bernard que ressaltou a importância da manutenção do equilíbrio do mesmo para a sobrevivência das células e do organismo, mas não deu nenhuma denominação específica a essa condição de equilíbrio. Posteriormente, em concordância com Claude Bernard, Willian Cannon chamou de homeostase essa condição de equilíbrio do meio interno. O estresse representa um desafio ao organismo capaz de alterar a homeostase, ou seja, o equilíbrio natural do organismo. Esse desafio trata-se de um estímulo chamado de estressor que pode ser físico ou emocional (FRANCI, 2005).

Hans Seyle foi o primeiro a observar que pacientes com enfermidades distintas apresentavam um conjunto de sintomas semelhantes, posteriormente ele realizou estudos experimentais em ratos e observou respostas semelhantes a estímulos inespecíficos, ou seja, o padrão não era o estímulo e sim as respostas, então ele definiu e descreveu essas respostas como sendo uma síndrome de adaptação a estímulos nocivos. Entre os sinais observados por ele, estão alteração do ciclo sexual, aumento da adrenal, ulcerações gastrointestinais entre outros, sinais que hoje já são bem definidos como sendo consequentes a exposição aos hormônios e outros subprodutos do estresse. Seyle ainda dividiu a síndrome de adaptação em três fases: fase de alarme (caracterizada por uma fase de reconhecimento do estímulo e resposta imediata), fase de resistência (caracterizada por uma manutenção da resposta) e fase de exaustão (onde o esforço do organismo em manter a homeostase passa a se tornar um

desgaste para o mesmo). O termo estresse só foi introduzido em seus trabalhos posteriores e foi difundido rapidamente no meio acadêmico, porém, havia muita controvérsia e dúvidas sobre a aplicação específica do mesmo. Foi então que em 1973, Hans publicou um artigo de revisão para definir estresse, estressor e síndrome de adaptação. Ele define “estresse como uma resposta não específica do corpo a uma demanda feita sobre ele”, segundo ele o agente indutor dessa resposta, o “estressor”, não pode ser completamente definido, pois o que é estressor para um indivíduo pode não ser para outro e só diante da resposta poderemos saber a intensidade e importância do estressor. Ele ainda deixa claro que síndrome de adaptação é um mecanismo fisiológico, natural e benéfico já que somos desafiados constantemente, mesmo em situações rotineiras como se levantar pela manhã (onde o organismo é desafiado, se prepara e responde a este estímulo) e assim conseqüentemente ao longo do dia, e em situações de risco, como realizar uma fuga se necessário. É essa adaptação que nos dá condições para isso (SEYLE, 1973).

A reação do organismo ao estresse envolve a ativação de sistemas complexos que resultam em alterações hormonais, autonômicas e comportamentais. Essas alterações levam a diferentes fenômenos fisiológicos que incluem: redistribuição de fluido sanguíneo com mobilização de energia para o cérebro e função muscular, estado de alerta, aumento da frequência cardíaca e respiratória, modulação da resposta imune, inibição da função reprodutiva e inibição do apetite. O controle da ativação dos diferentes sistemas frente a um estímulo de estresse envolve a participação do sistema nervoso central, que recebe informações e coordena as respostas neuroendócrinas de adaptação ao estresse (ELIAS & CASTRO, 2005). Porém tão importante quanto a mobilização de processos funcionais e comportamentais para manter o equilíbrio em resposta ao estressor é a desmobilização desses processos quando cessa o estímulo estressor. Assim tanto a mobilização quanto desmobilização inadequadas provocam as chamadas doenças de adaptação oriundas da ativação constante desses sistemas compensatórios (FRANCI, 2005). Esses mecanismos existem com a finalidade de dar suporte à vida em situações específicas por um determinado período de tempo e não indefinidamente.

### **2.1.1 Alostase e carga alostática**

Na condição de homeostase desafiada, o organismo reage por meio da ativação e desativação de mecanismos de controle de várias funções, para recuperar e manter a mesma. A recuperação da homeostase pode ocorrer pela eliminação do estressor. Porém mesmo em situações em que o estressor não é eliminado, é possível recuperar e manter a homeostase, sendo esse fenômeno chamado de “alostase” e representa uma sobrecarga para o organismo chamada de carga alostática. Esse mecanismo tem como finalidade manter o organismo em equilíbrio até que o estímulo estressor cesse, porém se o estímulo não for cessado ou mesmo se na ausência do estímulo o sistema alostático falhar em cessar sua resposta, ocorrerá uma sobrecarga ao organismo oriunda da ativação constante dos sistemas alostáticos, ligada direta ou indiretamente ao desenvolvimento de doenças endócrinas, cardiovasculares, bem como doenças psíquicas. Este efeito pode ser bem visualizado em pacientes que já possuíam fatores de risco para o desenvolvimento das mesmas, podendo ser fatores hereditários, sociais, hábitos alimentares e outros (MCEWN, 1998).

### **2.1.2 Estresse em cães.**

Cães quando expostos aos estressores de forma intermitente e prolongada, demonstram alterações comportamentais, fisiológicas e imunológicas que caracterizam o estresse crônico. Uma variedade de respostas comportamentais é observada nesses cães, entre elas vocalização frequente, baixa postura, levantar a pata, aumento na salivação, respiração ofegante, dentre outras. Similares às respostas comportamentais, alterações fisiológicas em cães submetidos a estresse se manifestam com uma grande variedade de parâmetros. A maioria das respostas fisiológicas ao estresse refletem alterações na atividade dos eixos Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e Simpato-adrenomedular. As mudanças no eixo HHA são normalmente estabelecidas pela medida de cortisol que tende a se mostrar elevado, enquanto o desempenho cardiovascular é mais frequentemente utilizado para investigar o eixo Simpato-Adrenomedular mostrando um aumento na frequência cardíaca e diminuição da variabilidade. Porém a adaptação ao estresse em situações de estresse crônico pode contrariar as respostas de estresse inicial e tornar parâmetros de estresse agudo inúteis na avaliação de estresse crônico, por isso vários parâmetros fisiológicos e comportamentais devem ser

avaliados de forma cuidadosa. Dados sobre as respostas imunológicas ao estresse em cães são escassos e indefinidos (BEERDA *et al.*, 1997), não podendo assim se tornarem parâmetros específicos para avaliação de estresse.

Portanto, o reconhecimento de outras alças neuroendócrinas não classicamente estudadas pode ser útil no estabelecimento de um diagnóstico mais fidedigno, sobretudo em animais submetidos ao estresse crônico. Uma dessas alças, que parece ser mais relevante, é o eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireoide (HHT) que será abordado em tópicos posteriores.

### **2.1.2.1 Isolamento social, restrição espacial, trabalho e cães.**

Cães submetidos à restrição espacial, ou seja, mantidos em ambientes pequenos e pobres e concomitantemente submetidos ao isolamento social, seja em relação a humanos ou a outros cães, começam a apresentar indícios significativos de estresse crônico, manifestados através de alterações comportamentais e fisiológicas (BEERDA *et al.*, 1999).

Cães de trabalho quando expostos a desafios, apresentam aumento nos níveis de cortisol, porém as alterações comportamentais não estão bem correlacionadas com o mesmo (HAVERBEKE *et al.*, 2008).

### **2.1.2.2 Alterações comportamentais em resposta ao estresse em cães.**

Estudos mostram que más condições de habitação para cães induzem alterações de comportamento, como aumento no ato de se limpar, aumento da manipulação do ambiente e de movimentos repetitivos (HEETS *et al.*, 1992; HUBRETCH *et al.*, 1992). Ainda segundo Heets *et al.* (1992), cães submetidos a isolamento social passam a maior parte do tempo em movimento e exibindo um maior número de comportamentos estranhos.

Segundo Walker *et al.* (2009), cães submetidos ao confinamento em ambientes pobres e pequenos, durante um longo período apresentam sinais de ansiedade e estresse como andar em círculos e postura de lamentação.

Estudos realizados em cães por Beerda *et al.* (1999a) mostraram que os principais sinais de estresse crônico induzido por isolamento social e restrição espacial são um aumento na frequência do ato de se limpar, de andar em círculo, de comer fezes, de levantar a pata, do

ato de suspirar e nas vocalizações. Os cães também apresentaram baixa postura, sentaram-se mais e caminharam menos. Houve também diminuição no ato de cavar, de se apresentarem ofegantes e na intenção de mudar de um estado de locomoção para o outro. Dentre estes sinais, houve aumento significativo e considerável no ato de se limpar, no levantamento da pata e nas vocalizações, por isso podem ser considerados parâmetros úteis na identificação do estresse crônico.

Em situações de estresse mais severo pode induzir os cães a realizarem comportamentos de termorregulação como aumento de salivação, respiração ofegante e anti-diurese (BEERDA, *et al.*, 1997).

Outras alterações de comportamento em cães com restrição espacial e social foram descritas por Spangenberg *et al.* (2006), como o ato de ficar de pé na duas patas traseiras apoiando-se no muro ou grade, saltando e movimentando-se e repetindo este movimento por várias vezes. Foi observado ainda aumento na postura de dominância quando visualizavam outros cães, evidenciando a agressividade. Assim, algumas alterações de comportamento são observadas apenas quando os cães estão diante de um desafio, mas que ainda assim devem ser levadas em consideração (BEERDA *et al.*, 1999 a). Já foi descrito que não somente o tamanho e o tipo de ambiente ou se é enriquecido ou não, que alteram o comportamento dos cães. O isolamento social, por si, é suficiente para levar a essas alterações (SPANGENBERG *et al.*, 2006).

### **2.1.2.3 Alterações hormonais em resposta ao estresse**

A exposição a condições hostis inicia uma serie de respostas organizadas para aumentar a probabilidade de sobrevivência. Estas respostas coordenadas são conhecidas como resposta ao estresse e são caracterizadas por alterações comportamentais, alteração na função autonômica e na secreção de diversos hormônios (CARRASCO & KAR, 2003).

#### **2.1.2.3.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal na resposta ao estresse**

O eixo hipotálamo – hipófise – adrenal (HHA) é parte integrante de um sistema neural e endócrino que, de acordo com estímulos internos ou externos, sofre variações visando a manutenção da homeostase do meio interno. O controle hipotalâmico sobre a secreção

hipofisária do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é multifatorial, sendo o hormônio liberador da corticotrofina (CRH) considerado o principal regulador fisiológico da secreção de ACTH. Outros fatores podem também modular a secreção de ACTH, como a vasopressina, angiotensina, ocitocina, catecolaminas e citocinas. O ACTH plasmático é o principal regulador da secreção de cortisol pelo o córtex da adrenal, porém outros hormônios, fatores ou citocinas, bem como a inervação do sistema nervoso autônomo do córtex da adrenal parecem participar da regulação da secreção do cortisol. Os neurônios parvocelulares que secretam CRH e vasopressina, juntamente com os neurônios catecolaminérgicos do *locus ceruleus* e outros grupamentos celulares da medula e ponte, constituem os principais reguladores centrais da resposta ao estresse, que ativam o eixo HHA e o sistema eferente simpático da medula adrenal (ELIAS & CASTRO, 2005).

O eixo HHA é ativado por diferentes tipos de estresse como, traumático, inflamatório ou psicológico. Em diferentes modelos experimentais, observa-se que vários paradigmas de estresse induzem a ativação dos neurônios parvocelulares que secretam CRH, entre os quais podemos citar: sobrecarga salina, hipoglicemia, imobilização, jejum, exposição ao éter e administração de citocinas. A magnitude da resposta do ACTH e cortisol ao estresse depende de vários fatores, dentre os quais se destacam a natureza do estresse, intensidade, rapidez de aparecimento, a associação com outro estresse e o tempo de exposição. Durante o estresse, há aumento da secreção de CRH e vasopressina, que resulta na secreção aumentada de ACTH e cortisol. O CRH é um dos neuropeptídeos responsáveis pela integração do processo de resposta adaptativa ao estresse, não só como mediador da ativação do eixo HHA, mas também como mediador das respostas autonômica, comportamental e imune (CARRASCO & KAR, 2003).

Outros fatores são recrutados durante diferentes tipos de estresse, potencializando a ação do eixo HHA, entre os quais a angiotensina II, citocinas e outros mediadores da inflamação. Exercícios físicos também podem estimular a secreção de ACTH e cortisol cuja resposta tem relação com a intensidade e o grau de treinamento físico. O ACTH é o principal regulador da secreção de glicocorticoide pelo córtex da adrenal. Porém, outros hormônios ou citocinas presentes na circulação sistêmica ou liberados pela medula adrenal, bem como informações neuronais via inervação autonômica do córtex adrenal, podem também participar da secreção do cortisol. Os glicocorticoides são os efetores terminais do eixo HHA e participam do controle da homeostase do organismo frente ao estresse, tendo papel

preponderante no término da resposta do eixo HHA, exercendo a regulação contra negativa a nível hipotalâmico e hipofisário. A interrupção desse mecanismo de contra regulação negativa tem sido implicada na fisiopatologia de alguns distúrbios, como a depressão, e resulta em concentrações elevadas de glicocorticoide. O efeito inibitório do glicocorticoide sobre a secreção de ACTH limita a exposição prolongada dos tecidos aos glicocorticoides, minimizando os efeitos catabólicos, anti-reprodutivos e imunossupressivos desses hormônios (ELIAS & CASTRO, 2005)

#### **2.1.2.3.1.1 Ciclo Circadiano**

O eixo HHA tem a arquitetura clássica dos grandes sistemas neuroendócrinos. O CRH e a vasopressina desencadeiam a liberação do ACTH sintetizado por células especializadas da hipófise, os corticotrofos, que tem como função estimular a síntese e liberação do cortisol a partir da zona fascicular do córtex da adrenal. O ritmo circadiano de secreção de ACTH reflete em um ritmo similar para liberação de cortisol. Primeiro ocorre uma gradual diminuição dos níveis plasmáticos de ACTH com o início do sono a um mínimo por volta de meia-noite, em seguida uma serie de picos de liberação de ACTH ocorrem, culminando em níveis máximos de ACTH e cortisol em cerca de seis horas. Seguindo este pico, há um declínio gradual de ambos os hormônios ao longo do dia com episódios ocasionais de secreção. A secreção de ACTH pode ocorrer após uma refeição ao meio dia, mas não pode ocorrer após uma refeição à noite. O padrão de horário de secreção de ACTH e cortisol é invertido em animais de hábitos noturnos. O nível de cortisol no plasma sanguíneo realiza um *feedback* negativo para eixo (NORRIS, 2007).

O estresse agudo ou crônico estimula diretamente o eixo HHA, resultando em aumento das secreções dos hormônios oriundos desse eixo, como o CRH, a vasopressina, o ACTH e o cortisol, com conseqüente elevação dos mesmos no plasma sanguíneo. Estudo realizado em cães submetidos à restrição espacial e isolamento social observou significativo aumento nos níveis de cortisol no período em que os cães estavam sob a restrição e o isolamento, em relação ao período em que os cães não se encontravam sob estresse (BEERDA *et al.*, 1999 b).

#### **2.1.2.3.1.2 Relação do cortisol com a glicose**

O cortisol é conhecido por ser um hormônio hiperglicemiante, isso porque ele é capaz de atuar tanto aumentando a gliconeogênese quanto reduzindo a utilização celular da glicose. O estímulo a gliconeogênese se dá de duas formas: o cortisol aumenta as enzimas necessárias para conversão de aminoácidos em glicose pelas células hepáticas e também provoca mobilização de aminoácidos a partir de tecidos extra-hepáticos principalmente dos músculos, dessa forma mais aminoácidos são disponibilizados no plasma para entrar em processo de gliconeogênese pelo fígado e portanto promover a formação de glicose. Tanto o aumento da taxa de gliconeogênese quanto a redução moderada na velocidade de utilização da glicose pelas células irão provocar elevação da concentração da glicose sanguínea. Esta elevação por sua vez provoca a estimulação da secreção de insulina, no entanto os maiores níveis plasmáticos de insulina não são tão efetivos na manutenção dos níveis plasmáticos de glicose como ocorre em condições normais. Por motivos ainda não inteiramente compreendidos, os altos níveis de glicocorticóides reduzem a sensibilidade de muitos tecidos, especialmente músculo esquelético e tecido adiposo, aos efeitos estimulantes da insulina sobre a captação e utilização da glicose (GUYTAN & HALL, 2006). Assim o acompanhamento dos níveis plasmáticos da glicose juntamente com o cortisol pode auxiliar na identificação do estresse.

#### **2.1.2.4 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide em resposta ao Estresse.**

O Hormônio Liberador da Tireotrofina (TRH) é expresso em neurônios parvicelulares dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, sendo armazenado nos axônios e liberado sob condições específicas, ao sistema porta hipotálamo-hipofisário, participando assim, da regulação da atividade tireotrófica. O TRH atua nos tireotrofos da glândula hipófise estimulando a transcrição gênica e a secreção do hormônio tireotrófico ou tireotrofina (TSH). O TSH é sintetizado e secretado pelos tireotrofos, na hipófise ele é o principal regulador do crescimento e da função da glândula tireoide, interage com receptores presentes na membrana da célula folicular tireoidiana estimulando a expressão de proteínas envolvidas na indução de seus efeitos proliferativos e na biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos (NUNES, 2005).

Os principais reguladores da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide são os próprios hormônios tireoidianos que atuam no hipotálamo e hipófise, modulando tanto a síntese quanto a secreção nas diferentes situações fisiológicas. Esse mecanismo é conhecido como retroalimentação negativa, ou *feedback* negativo, e implica a compreensão de que os hormônios tireoidianos, mesmo em concentrações fisiológicas, exercem uma ação tônica inibitória sobre a síntese e a secreção de Somatostatina (SS), de modo a garantir que a sua secreção basal seja mantida. Assim em baixas concentrações plasmáticas, tanto seu efeito inibitório sobre o TRH e TSH quanto o seu efeito estimulante sobre a SS ficam reduzidas, o que causa maior liberação de TRH e TSH, estimulação da atividade tireoidiana e elevação da taxa de seus hormônios na circulação. O contrário ocorre quando eles se apresentam em altas concentrações plasmáticas, situação em que haverá maior inibição do TRH e TSH e maior estimulação da SS, efeitos que em conjunto reduzem a atividade tireoidiana e a concentração plasmática de seus hormônios (NUNES, 2008).

Fatores capazes de alterar a atividade do eixo, como: temperatura e luz ambiente, estado alimentar e estresse, levam a ajustes homeostáticos que confirmam a importante função desse sistema na regulação da temperatura corporal, no metabolismo energético e no estresse (NUNES, 2008). A relação dos glicocorticoides e o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide vem sendo investigado a décadas. Em 1955, Ingbar e Freninkel concluíram que as ações dos glicocorticoides nos derivados tireoidianos não eram de origem periférica como se acreditava, mas também não conseguiram elucidar se os efeitos seriam diretamente relacionados a hipófise ou a tireoide (INGBAR & FRENINKEL, 1955).

Já em 1969, Wilber e Utiger realizaram um estudo para observar a relação direta entre os glicocorticóides e a secreção de TSH, para isso utilizaram dois experimentos sendo um em humanos e outro em ratos, ambos contendo indivíduos saudáveis e indivíduos portadores de hipotireoidismo. O resultado encontrado foi semelhante tanto entre humanos e ratos, quanto entre indivíduos portadores de hipotireoidismo e indivíduos saudáveis. O experimento consistiu na avaliação dos níveis de TSH antes e depois da administração de dexametasona, e foi observada uma diminuição significativa nos níveis de TSH depois da exposição a altas concentrações de glicocorticóides, também foi observado que os níveis de TSH voltaram aos valores iniciais de 24-48 horas após a administração (WILBER & UTIGER, 1969).

Segundo Olivares *et al.* (2012), há uma relação direta entre o estresse e a função tireoidiana. Desta forma, a resposta ao estresse pelo eixo HHT pode variar consideravelmente

em relação ao tipo de estressor e o tempo de exposição ao mesmo, podendo ocorrer desde inibição e estimulação como o eixo permanecer inalterado, até mesmo as três respostas podem ser encontradas em estágios temporais diferentes como uma estimulação inicial seguida por inibição. Em um trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo, verificou-se que ratos submetidos a estresse social crônico, pelo paradigma residente-intruso, se mostraram hipotireoideos nas primeiras semanas e o tratamento com antidepressivo foi parcialmente eficaz em prevenir tal alteração (OLIVARES *et al.* 2012). Isto sugere que o eixo HHT tem importante papel no estresse e que os mecanismos que desencadeiam tais alterações precisam ainda ser mais bem explorados.

#### **2.1.2.4.1 Hipotireoidismo Canino.**

As anormalidades estruturais ou funcionais da glândula tireoide podem levar a produção deficiente de hormônios tireoidianos. Um esquema de classificação conveniente para o hipotireoidismo foi criado e baseia-se na localização do problema dentro do complexo glandular hipotálamo-hipófise-tireoide. O hipotireoidismo primário é a forma mais comum deste distúrbio em caninos, ele resulta em problemas dentro da glândula tireoide, geralmente a destruição da glândula. Os dois achados histológicos mais comuns neste distúrbio são a tireoide linfocítica e a atrofia idiopática da glândula tireoide. A tireoide linfocítica é um distúrbio imunologicamente mediado, caracterizado por uma infiltração difusa de linfócitos, macrófagos e plasmócitos na glândula tireoide. Os fatores que desencadeiam a tireoide linfocítica são pouco compreendidos, mas fatores genéticos indubitavelmente desempenham um papel. Já atrofia idiopática da glândula tireoide é caracterizada por perda do parênquima tireoidiano. Não há infiltrado inflamatório. A causa da atrofia tireoidiana idiopática é desconhecida, mas ela pode ser um distúrbio degenerativo primário, bem como pode representar o estágio final de uma tireoide linfocítica.

O hipotireoidismo secundário resulta da falha de desenvolvimento dos tireotrofos hipofisários ou da disfunção dentro deles, causando secreção deficiente de TSH e uma deficiência secundária na síntese e secreção do hormônio da tireoide. O hipotireoidismo secundário também poderia ocorrer devido à destruição dos tireotrofos hipofisários como na neoplasia hipofisária ou por supressão da função tireoidiana por drogas ou hormônios como o

cortisol. O hipotireoidismo terciário por deficiência de TRH ainda não foi relatado em caninos (NELSON & COUTO, 2006).

A incidência é maior em cães entre 4 e 10 anos de idade e de médio a grande porte. Os sinais clínicos mais comuns em cães hipotiróideos são alopecia bilateral com ou sem hiperpigmentação; letargia física; embotamento mental; intolerância ao frio; frequência cardíaca baixa; infertilidade, constipação e ganho de peso. Achados laboratórios importantes juntamente com níveis baixos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> são anemia e a hipercolesterolemia que pode estar presente em até 75% dos cães. Porém a ocorrência primária da deficiência dos hormônios tireoidianos pode ser lenta e insidiosa, e os sinais clínicos e achados laboratoriais podem ser inespecíficos (CHANSTAIN & PANCIERA, 1997).

O diagnóstico do hipotireoidismo canino é baseado em sinais clínicos e principalmente achados laboratórios, para isso utiliza-se dosagens hormonais e para sua interpretação se utiliza os dados de valores de normalidade da espécie já amplamente descritos e definidos na literatura, com mínimas variações entre eles: Para o T<sub>3</sub>: 0,5-1,8 ng/dL (JOHNSON, 2011), T<sub>4</sub>: 1,5-3,6 mcg/dL (ESPINEIRA *et al.*, 2007), TSH: 0-39 mcUI/L (KANEKO *et al.*, 1997) e para o Colesterol: 139-171 mg/dL (MEYER, *et al.*, 1995). Importante ressaltar que essas referências é que serão utilizadas como base comparativa dos níveis séricos hormonais neste estudo.

#### **2.1.2.4.1.1 Relação entre o Hipotireoidismo e o Colesterol.**

O colesterol está presente na dieta de todos os indivíduos, pode ser absorvido lentamente pelo trato gastrointestinal e é altamente lipossolúvel. Além do colesterol absorvido todos os dias pelo trato gastrointestinal, que é chamado colesterol exógeno, uma quantidade ainda maior é formada nas células do corpo, o chamado colesterol endógeno.

Essencialmente todo colesterol endógeno que circula nas lipoproteínas do plasma é formado pelo fígado, mas todas as outras células do corpo formam pelo menos algum colesterol, que constitui de alguma forma, estruturas membranosas. A estrutura básica do colesterol é um núcleo esterol. Este é sintetizado inteiramente a partir de diversas moléculas de acetil-CoA. Por sua vez o núcleo esterol pode ser modificado através de diversas cadeias laterais para formar: colesterol; ácido cólico que é a base dos ácidos biliares formados no

fígado; e muitos hormônios esteroides importantes secretados pelo córtex adrenal, ovários e testículos (GUYTON & HALL, 2006).

Ainda de acordo com Guyton e Hall (2006), o controle dos níveis plasmáticos de colesterol no organismo se dá por diversos fatores: o aumento da quantidade de colesterol ingerido ao longo do dia eleva ligeiramente os níveis plasmáticos já que atuam diretamente provocando um feedback negativo para produção do colesterol endógeno, já a ingestão de gorduras saturadas pode levar a aumentos mais significativos do colesterol e em contrapartida a ingestão de ácidos graxos insaturados pode levar a uma queda dos níveis de colesterol. Outro fator importante na regulação dos níveis séricos de colesterol são os hormônios tireoidianos que quando baixos resultam em aumento nos níveis de colesterol e vice e versa. Estes efeitos são provavelmente causados por modificações no grau de ativação de enzimas específicas responsáveis pelo metabolismo de substâncias lipídicas. Outro mecanismo pelo qual o hormônio tireoidiano reduz os níveis de colesterol é através de um aumento significativo da excreção do mesmo pela bile.

#### **2.1.2.4.1.2 Relação entre o Hipotireoidismo e o Lactato.**

Do ponto de vista metabólico, os músculos esqueléticos são capazes de realizar extremas proezas por alguns poucos segundos, mas são muito menos capazes de fazê-los durante a atividade prolongada. A maior parte da energia extra não pode vir dos processos oxidativos, pois eles são lentos demais em sua resposta. Em vez disso, a energia extra provem de fontes anaeróbias, como a liberada pela quebra glicolítica do glicogênio em ácido láctico. A liberação de energia pela glicólise pode ocorrer muito mais rapidamente do que liberação oxidativa, conseqüentemente a maior parte da energia extra durante a atividade vigorosa, que perdure por mais 5 a 10 segundos é originada da glicólise anaeróbia. Como consequência, o conteúdo de glicogênio nos músculos durante o período de atividade vigorosa é reduzido, enquanto a concentração de ácido láctico no sangue aumenta (GUYTON & HALL, 2006). Dessa forma, a utilização de medidores de lactato sanguíneo antes e depois do exercício, se torna um importante instrumento para avaliação da intensidade da atividade física para aquele indivíduo e também para diferenciação entre as atividades.

Além disso, o nível sérico de lactato pode se mostrar um bom parâmetro indicativo para algumas desordens sistêmicas, entre elas o hipotireoidismo. Um estudo realizado com

pacientes portadores de hipotireoidismo clínico e subclínico observou que os níveis de lactato basal nesses pacientes eram significativamente mais elevados em relação aos pacientes não portadores, mostrando também uma relação direta inversamente proporcional entre os níveis sanguíneos de lactato e T<sub>4</sub> livre (MCGROWDER et al., 2011) e lactato e T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (ROTI et al., 1980).

### **3. OBJETIVOS**

Baseando-se na falta de informações, bem como na controvérsia de dados concernentes ao estresse em cães de policiamento na literatura, bem como a ausência de estudos que se preocuparam em investigar diferentes alças neuroendócrinas nestes animais, este estudo teve como objetivos:

#### **3.1 Objetivos Gerais**

- Avaliar e caracterizar parâmetros neuroendócrinos em cães de policiamento mantidos em condições de isolamento social e restrição espacial.
- Comparar as resposta neuroendócrinas ao estresse em diferentes desafios de trabalho.
- Comparar as resposta neuroendócrinas entre machos e fêmeas ao estresse de trabalho.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Estudar as respostas secretórias dos hormônios dos eixos HHA e HHT em cães de policiamento submetidos ao isolamento social e restrição espacial.
- Investigar as respostas secretórias dos hormônios dos eixos HHA e HHT antes e após diferentes tipos de trabalho (baixa e alta intensidade) em cães de policiamento submetidos ao isolamento social e restrição espacial.
- Estudar o possível dimorfismo sexual nas respostas secretórias hormonais basais e após diferentes modalidades de trabalho em cães de policiamento submetidos ao isolamento social e restrição espacial.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob o protocolo de número 23083.009172/2012-13

### **4.1 Animais**

O estudo foi realizado com cães de policiamento que são utilizados para diversos tipos de trabalho como guarda pessoal, ataque e proteção, faro de drogas, garantia da lei e da ordem em distúrbios e guarda de território. Foram utilizados 15 cães (7 machos e 8 fêmeas) com idades entre 3 e 7 anos e que foram submetidos a dois tipos (cargas) de trabalho: adestramento básico (baixo impacto) e ataque (alto impacto). Os animais foram submetidos ao manejo de isolamento social/restrrição espacial sendo alojados em canis de aproximadamente 1,5m x 2m sendo, para tanto, mantidos em canis individuais e manipulados somente para o trabalho. Estes animais estão condicionados a este tipo de manejo desde o início de seu treinamento, que ocorre por volta dos oito meses de vida. Desta forma, estes animais não passaram por período de adaptação ao experimento, pois já se encontravam expostos a tais condições por no mínimo três anos.

### **4.2 Condições Clínicas**

Antes de iniciar o estudo, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica e laboratorial com realização de hemograma completo, EAS e exame coprológico, a fim de verificar se a sanidade dos animais se adequava ao estudo. Constatando que os animais estavam aptos para o experimento, isto é, sem sinais e sintomas claros de alterações hematológicas, parasitárias, alterações renais, entre outras, os mesmos foram separados para o estudo. Nas fêmeas, atenção especial foi dada a fase do ciclo estral que elas se encontravam, avaliado por meio de esfregaço vaginal, antes, durante e no final do protocolo experimental, para se avaliar a influência do mesmo nos resultados. Constatando que todas as fêmeas se encontravam em anestro, portanto na mesma fase do ciclo e ainda sendo seu período de repouso, as mesmas foram mantidas no estudo.

### **4.3 Exames Laboratoriais**

O sangue foi acondicionado em tubos sem anticoagulantes, mantido em refrigeração, posteriormente em no máximo duas horas, o sangue foi processado para obtenção do soro e então novamente acondicionado para ser transportado para o laboratório onde ficou armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até realização das dosagens hormonais por meio da técnica de quimioluminescência e para dosagem do colesterol.

#### **4.3.1 Avaliação Hormonal**

A avaliação hormonal foi realizada através da coleta de sangue por punção da veia cefálica para realização das dosagens dos hormônios: Cortisol, TSH,  $T_3$  e  $T_4$  por meio de quimioluminescência. O método de quimioluminescência foi utilizado para as dosagens sérica dos hormônios e foi realizado no laboratório de análises hormonais do Instituto de Biologia do Exército. O sistema de análise, *Immulate*, possui unidades teste recobertas com anticorpo específico para o hormônio específico, atuando como um ensaio fase sólida, que serve de base para a reação imune, a incubação, a lavagem e o desenvolvimento do sinal. A emissão de luz do substrato quimioluminescente reage com o conjugado enzimático e é proporcional a quantidade de substâncias a serem analisadas, originalmente presentes na amostra do animal. Essa técnica possui como vantagem a praticidade de execução e a menor variação durante a pipetagem, pois o técnico só precisa acrescentar as amostras nos tubos, sendo que os demais reagentes são adicionados pelo próprio equipamento. Entretanto algumas desvantagens são notadas em relação ao radioensaio, como a menor sensibilidade a valores muito baixos e a necessidade de ambiente refrigerado, pois os reagentes só atuam adequadamente em baixas temperaturas. Para dosagem de cortisol foi utilizado o equipamento *IMMULITE 2000 XPi Immunoassay System* e o teste *IMMULITE® 2000 Cortisol* e para as dosagens de  $T_3$ ,  $T_4$  e TSH foi utilizado o equipamento *ADVIA Centaur XP Immunoassay System* e os testes *ADVIA Centaur® T3*, *ADVIA Centaur® T4* e *ADVIA Centaur® TSH 3UL*.

### **4.3.2 Dosagem do colesterol**

As dosagens de colesterol foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Biologia do Exército, através de análise bioquímica utilizando o equipamento *VITROS® 5,1 FS Chemistry System* e o teste específico para colesterol *Reativos Secos VITROS para CHOL*.

### **4.3.3 Dosagem de lactato e glicose.**

A obtenção dos dados de lactato e glicose foi realizada *in loco* e em tempo real através da utilização do medidor de lactato *Accutrend® Plus Roche* e do medidor de glicose *Accu-Chek Performa Roche* ambos os aparelhos foram utilizados com as suas respectivas tiras onde uma gota de sangue era colocada para obtenção dos resultados.

## **4.4 Protocolo Experimental**

Para a realização deste estudo, os 15 cães foram divididos em dois grupos: 1. Ataque e proteção (AP) e 2. Adestramento Básico (AB), com sete e oito indivíduos (respectivamente) que foram selecionados de acordo com sua aptidão para atividade que seu grupo iria exercer. Dessa forma, animais com maior aptidão para o ataque foram designados para o grupo de ataque e proteção e os animais com maior aptidão para o treinamento de obediência foram designados para o grupo de adestramento básico. Os animais foram acompanhados em dois experimentos da seguinte forma:

### **4.4.1 Primeira Fase**

Duas semanas antes do primeiro experimento (experimento 1), os animais de ambos os grupos foram submetidos a coleta de sangue pela veia cefálica para a obtenção dos valores hormonais basais, de glicose e lactato. Estes dados foram utilizados para se traçar um panorama dos animais em estado de não-atividade, em sua rotina habitual sem qualquer interferência oriunda das atividades do experimento. Assim, menções futuras no texto dos

valores obtidos nesta fase serão chamadas de “Basal”, refletindo portanto, os níveis basais dos hormônios que serão estudados.

#### **4.4.2 Segunda Fase**

Duas semanas após a primeira fase do experimento, os animais de ambos os grupos foram submetidos a uma coleta basal (que será chamada de T0 para os animais que realizaram atividade imediatamente após a coleta) as 8:00 horas para determinação dos valores hormonais, de glicose e lactato basais. Posteriormente a coleta, o grupo AB foi levado de volta ao canil onde permaneceu sem realização de qualquer atividade. Em contrapartida, o grupo AP foi designado para o trabalho imediatamente após a coleta. O motivo pelo qual todos os animais foram submetidos à coleta, grupo AP que realizou a atividade e grupo AB que não realizou, é a avaliação da possível influência da homeostase preditiva, isto é, alterações antecipatórias da possível atividade, sobre os parâmetros bioquímicos que foram avaliados neste estudo. A atividade do grupo AP consistiu em realização individual do trabalho de ataque durante 10 minutos. Esta atividade se resume em um condutor (soldado capacitado para o treinamento dos cães) direcionar o cão preso a uma guia para uma área aberta onde outro condutor aguarda devidamente paramentado, distante aproximadamente dez metros do cão. Então se inicia um processo onde o condutor de posse do cão o instiga a atacar e depois de alguns instantes, o cão é solto da guia para que possa efetivamente atacar o outro condutor, e este, depois de atacado tenta se desvencilhar do cão, que então recebe o comando de cessar o ataque, sendo novamente preso à guia. O mesmo treinamento é repetido por algumas vezes.

Após os 10 minutos desse treinamento, os cães foram conduzidos para a segunda coleta de sangue (T1) novamente para obtenção dos dados hormonais, glicose e lactato. Após esta coleta, os cães do grupo AP foram reconduzidos aos seus respectivos canis para um período de descanso 30 minutos. Imediatamente após o descanso, os mesmos cães foram reconduzidos para última coleta de sangue (T2) também para a obtenção dos dados hormonais, de glicose e lactato. Finalmente os cães foram devolvidos aos canis sem mais atividades. As Figuras 1, 2 e 3 ilustram animais representativos do grupo AP realizando a tarefa de alto impacto.



Fig. 1: Treinamento de ataque e proteção. Note o momento em que o cão promove o ataque ao condutor. Este tipo de treinamento de ataque e proteção foi considerado um treinamento de alto impacto.



Fig. 2: Treinamento de ataque e proteção. Note o momento em que o cão é instigado a atacar o outro condutor para a realização do treinamento de ataque e proteção.



Fig. 3: Treinamento de ataque e proteção. Note o momento em que o cão promove o ataque ao condutor.

#### 4.4.3 Terceira Fase

Uma semana após a segunda fase do experimento, os animais de ambos os grupos foram submetidos a uma coleta basal (que será chamada de T0 para os animais que forem realizar atividade imediatamente após a coleta) as 8:00 horas para determinação dos valores hormonais, de glicose e lactato basais. Posteriormente a coleta, o grupo AP foi levado de volta ao canil onde permaneceu sem realização de qualquer atividade. Em contra partida, o grupo AB foi designado para o trabalho imediatamente após a coleta, que consistiu em realização individual do trabalho de adestramento durante 10 minutos. Esta atividade se resume em um condutor (soldado capacitado para o treinamento dos cães) direcionar o cão preso a uma guia para uma área aberta e então o cão recebe diversos comandos como: sentar, deitar, ficar, caminha junto ao condutor e o cão deve permanecer na posição até que condutor lhe de outro comando. O mesmo treinamento é repetido por algumas vezes, até que após 10 minutos de

trabalho, os cães foram conduzidos para segunda coleta de sangue (T1) novamente para obtenção dos dados hormonais, glicose e lactato. Após esta coleta, os cães do grupo AB foram levados para seus respectivos canis para um período de descanso 30 minutos, imediatamente após o descanso os mesmos cães foram reconduzidos para última coleta de sangue (T2) também para a obtenção dos dados hormonais, glicose e lactato. Finalmente os cães foram devolvidos aos canis sem mais atividades. As Figuras 4, 5 e 6 ilustram animais representativos do grupo AB realizando as tarefas de sentar, abaixar e deitar respectivamente.



Fig.4: Treinamento de adestramento básico. Note o animal realizando o comando de sentar dado pelo condutor. Este tipo de atividade foi considerada de baixo impacto.



Fig.5: Treinamento de adestramento básico. Note o animal realizando o comando de abaixar dado pelo condutor.



Fig.6: Treinamento de adestramento básico. Este tipo de atividade foi considerada de baixo impacto.

## 5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  s.e.m (erro padrão da média) e para verificar a diferença entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, dependendo das características dos dados, seguidamente o teste de comparação múltipla de *Bonferroni* quando indicado. Em todos os testes, o grau mínimo de significância será de 95% ( $P < 0,05$ ) ou de 99% ( $P < 0,01$ ) e os cálculos realizados no computador pelo programa *GraphPad Prism*® (versão 5, *GraphPad software, Inc., San Diego, USA*).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Avaliação Basal

A análise basal consistiu em caracterizar o estado dos animais em sua condição de repouso e para tanto foram realizadas três coletas de cada indivíduo em dias alternados: BI (coleta basal realizada 15 dias antes do experimento para reconhecimento do estado geral dos cães), BSA (coleta basal realizado no dia em que animal não realizaria atividade) e BCA (coleta basal realizada antes do animal ser direcionado para as atividades de trabalho). Todas as coletas foram realizadas entre 8:00 e 9:00 horas, afim de se obter dados confiáveis de seus índices basais.

#### 6.1.1 Cortisol

De acordo com a Figura 7, observa-se que os níveis séricos de cortisol em ambos os sexos, representados em termos dispersão dos valores individuais de cada grupo, se encontravam dentro da faixa considerada normal para espécie (entre 0,4 e 6,0  $\mu\text{g/dL}$ , JOHNSON, 2011) para os três grupos (os três diferentes dias de coleta). Quando estes dados são apresentados apenas em machos (Figura 8) ou fêmeas (Figura 9), o perfil de distribuição dos valores não muda entre grupos e entre os sexos. Estes dados sugerem não ter havido diferenças significativas entre machos e fêmeas e também entre os diferentes dias de coleta, demonstrando que possivelmente, este seja o padrão basal dos animais, não tendo o dia da coleta ou o sexo influência nos níveis séricos de cortisol em nosso estudo.

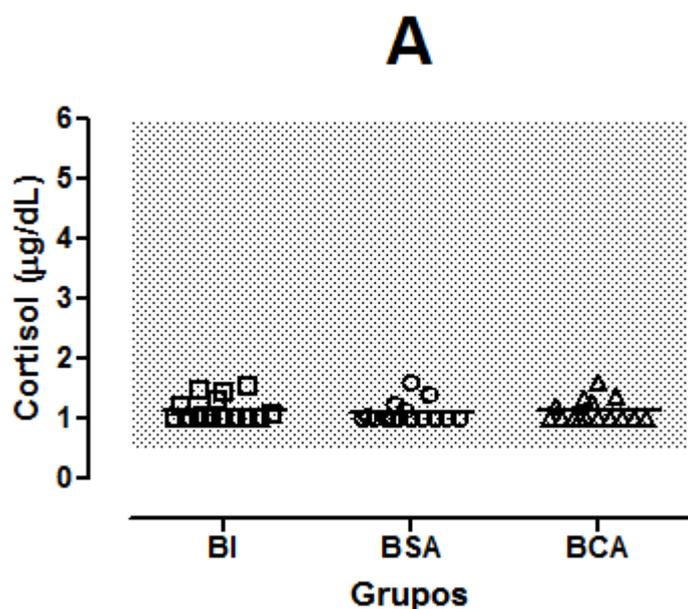


Figura 7. Níveis de cortisol obtidos por quimioluminescência nos três dias de avaliação em comparação com os níveis de cortisol basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza: entre 0,4 e 6,0 µg/dL). N= 15 (7 machos e 8 fêmeas). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni*. e  $P < 0,05$ .

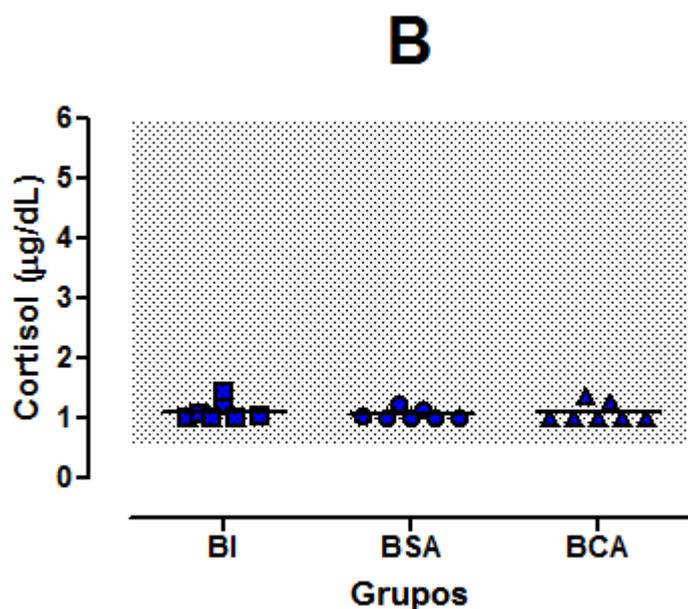


Figura 8: Níveis de cortisol nos machos obtidos por quimioluminescência nos três dias de avaliação em comparação com os níveis de cortisol basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza: entre 0,4 e 6,0 µg/dL). N = 7 machos. Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni*.  $P < 0,05$ .

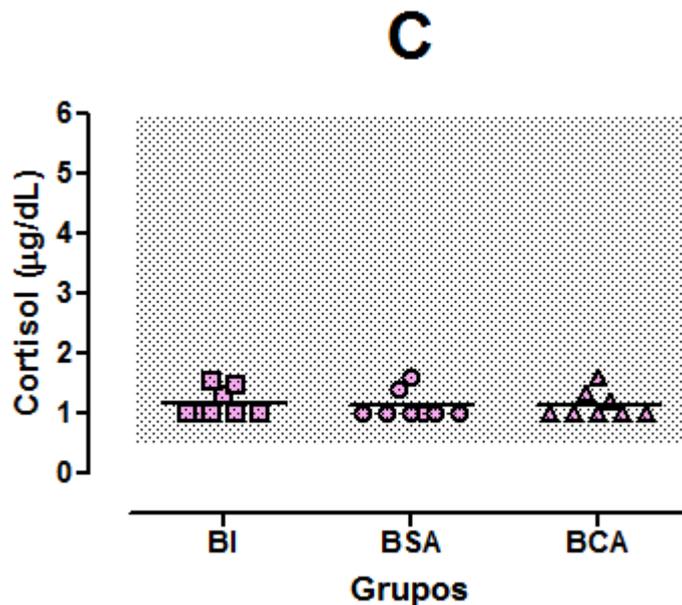


Figura 9: Níveis de cortisol obtidos nas fêmeas por quimioluminescência nos três dias de avaliação em comparação com os níveis de cortisol basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza: entre 0,4 e 6,0 µg/dL). N = 8 fêmeas). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni*.  $P < 0,05$ .

### 6.1.2 Eixo HHT

Os níveis de TSH basal que são apresentados nas Figuras 10, 11 e 12 foram analisados em 15 indivíduos, sendo sete machos e oito fêmeas. Embora os animais tenham apresentado uniformidade na distribuição dos valores tanto em relação aos diferentes dias de coleta, como quanto no comparativo entre os sexos, mostrando não haver diferenças claras entre machos e fêmeas, os valores encontrados se mostram muito acima do esperado para espécie como valores de normalidade descritos na literatura (de 0 - 0,39 µUI/L, VADEN et al., 2009; KANEKO, 1997). Estes dados sugerem hipertireotrofinemia em todos os animais estudados, independentemente do sexo e do dia em que foi realizada a coleta basal.

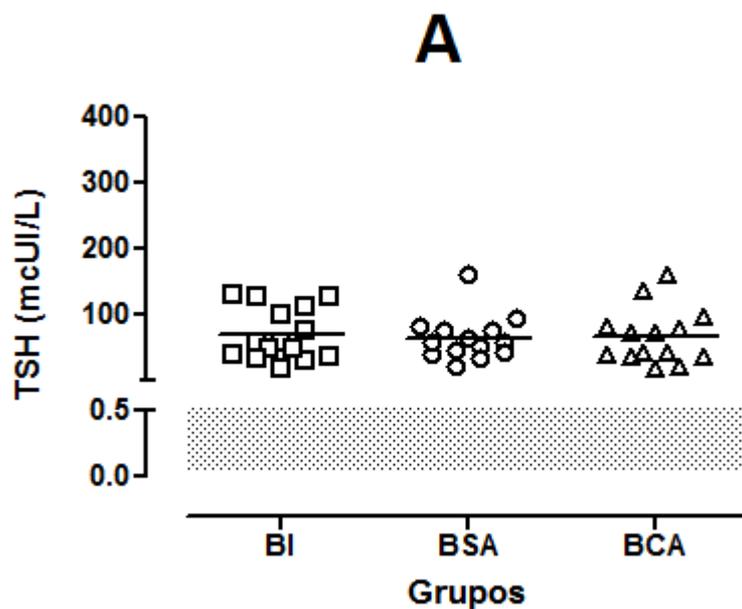


Figura 10: Níveis séricos de TSH nos três dias de avaliação em comparação com níveis séricos de TSH basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza: entre 0 - 0,39  $\mu$ UI/L). N = 15 (7 machos e 8 fêmeas/grupo). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e  $P < 0,05$ .

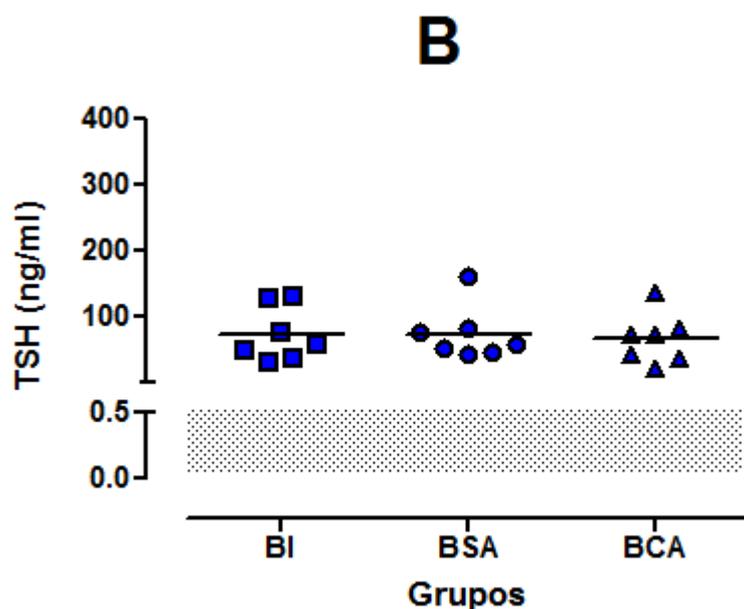


Figura 11: Níveis séricos de TSH nos três dias de avaliação em comparação com nível de TSH basal descrito na literatura como referência para espécie demonstrado pela região pontilhada em cinza entre 0 - 0,39  $\mu$ UI/L. N = 7 machos/grupo. Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e  $P < 0,05$ .

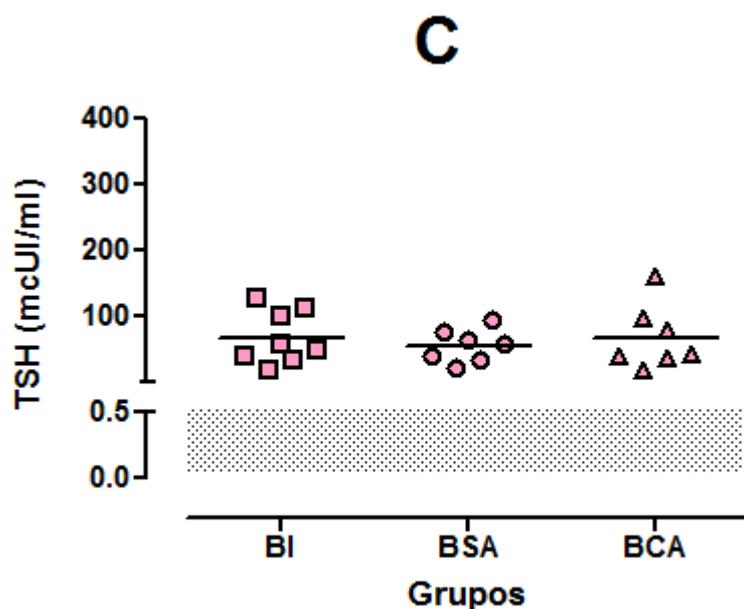


Figura 12: Níveis séricos de TSH nos três dias de avaliação em comparação com nível de TSH basal descrito na literatura como referência para espécie demonstrado pela região pontilhada em cinza entre 0 - 0,39  $\mu$ UI/L. N = 8 fêmeas/grupo). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e  $P < 0,05$ .

Corroborando os altos valores de TSH encontrados em todos os cães, os níveis basais de T<sub>3</sub> apresentados nas figuras 13, 14, e 15 e de T<sub>4</sub> apresentados nas figuras 16, 17 e 18 mostram que embora também uniformes em relação às diferentes coletas e aos sexos, eles se apresentaram significativamente diminuídos no comparativo com os valores descritos como normais pela literatura de T<sub>3</sub> (0,5-1,8 ng/dL, JOHNSON, 2011) e T<sub>4</sub> (1,5-3,6 µg/dL, ESPINEIRA, 2007).

Estes dados em conjunto sugerem que todos os animais avaliados neste estudo apresentaram um quadro de hipotireoidismo primário, isto é, baixos níveis de hormônios tireoidianos associados a elevados níveis de TSH, independentemente do sexo e do dia em que se realizaram as coletas basais.

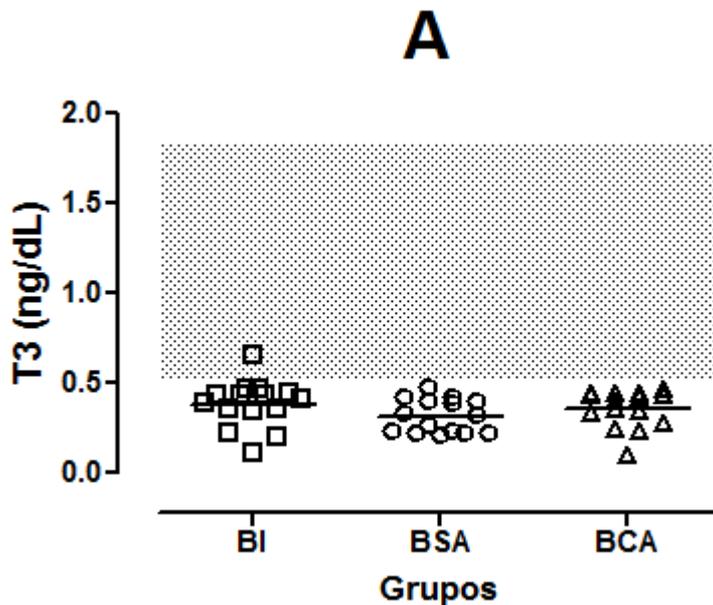


Figura 13: Níveis séricos de T<sub>3</sub> nos três dias de avaliação em comparação com nível de T<sub>3</sub> basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza entre 0,5 - 1,8 ng/dL). N = 15 (7 machos e 8 fêmeas/grupo). Os dados representam os valores médios ± S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e P < 0,05.

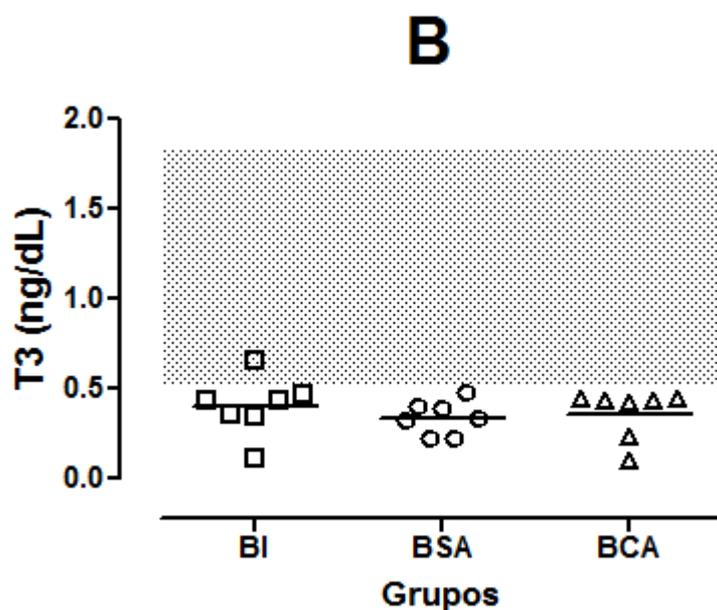


Figura 14: Níveis séricos de T<sub>3</sub> obtidos nos machos nos três dias de avaliação em comparação com nível de T<sub>3</sub> basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza entre 0,5 - 1,8 ng/dL). Note os baixos níveis de T<sub>3</sub> encontrados no soro de todos os animais e a semelhança nas medias obtidas nos três dias diferentes de coleta. N = 7 machos/grupo. Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e  $P < 0,05$ .

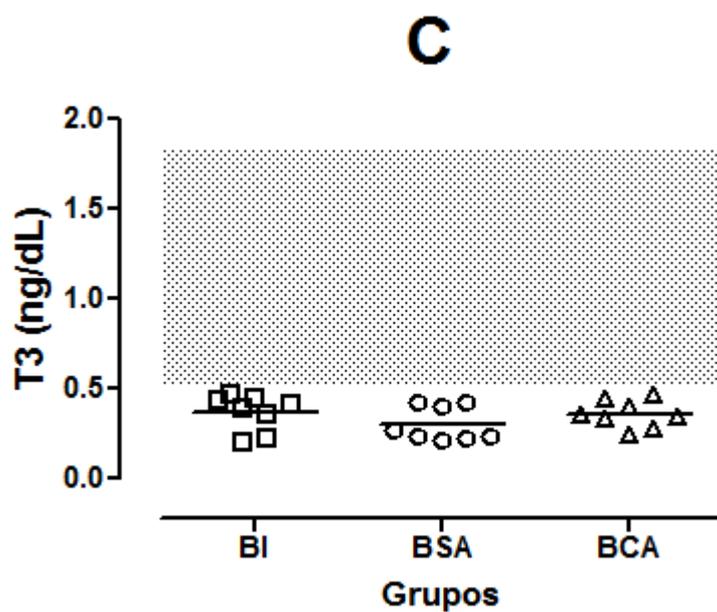


Figura 15. Níveis séricos de T<sub>3</sub> obtidos nas fêmeas nos três dias de avaliação em comparação com nível de T<sub>3</sub> basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza entre 0,5 - 1,8 ng/dL). Note os baixos níveis de T<sub>3</sub> encontrados no soro de todos os animais e a semelhança nas medias obtidas nos três dias diferentes de coleta. N = 8 fêmeas/grupo. Os dados representam os valores médios ± S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e P < 0,05.

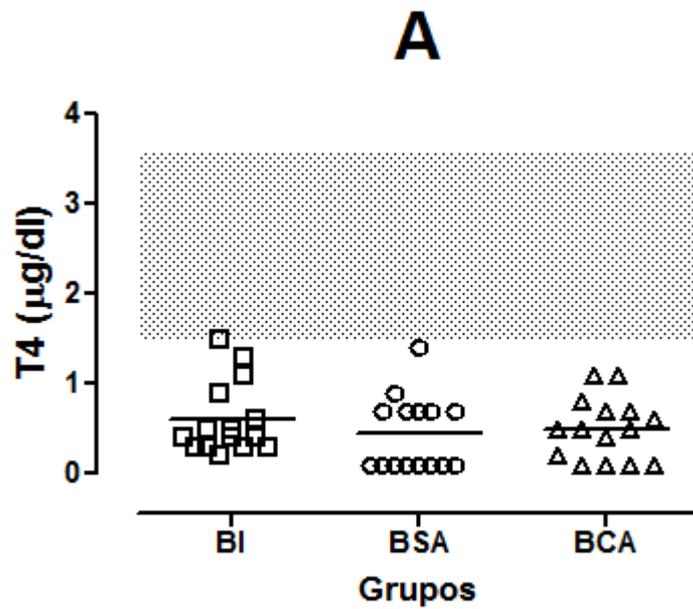


Figura 16: Níveis séricos de T<sub>4</sub> obtidos em ambos os sexos nos três dias de avaliação em comparação com nível de T<sub>4</sub> basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza entre 1,5-3,6 µg/dL Note os baixos níveis de T<sub>4</sub> encontrados no soro de todos os animais e a semelhança nas medias obtidas nos três dias diferentes de coleta. N = 15 (7 machos e 8 fêmeas/grupo). Os dados representam os valores médios ± S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e P < 0,05.

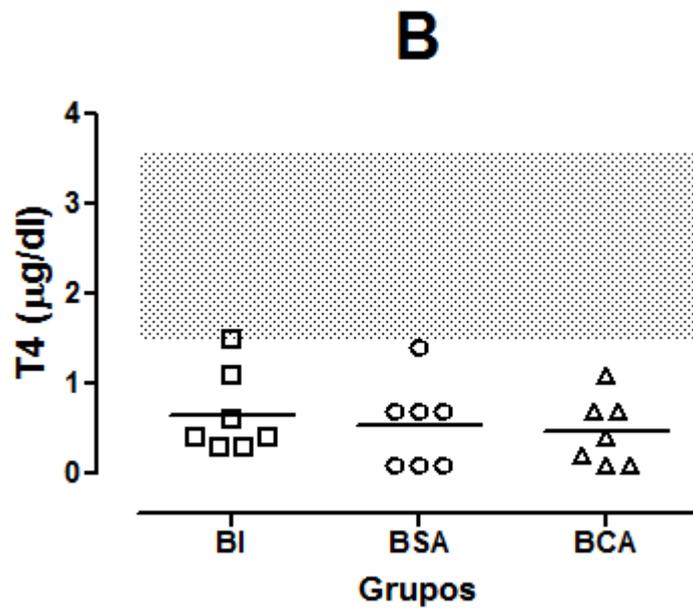


Figura 17: Níveis séricos de T<sub>4</sub> obtidos nos machos nos três dias de avaliação em comparação com nível de T<sub>4</sub> basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza entre 1,5 - 3,6 µg/dL). Note os baixos níveis de T<sub>4</sub> encontrados no soro de todos os animais e a semelhança nas médias obtidas nos três dias diferentes de coleta. N = 7 machos. Os dados representam os valores médios ± S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e P < 0,05.

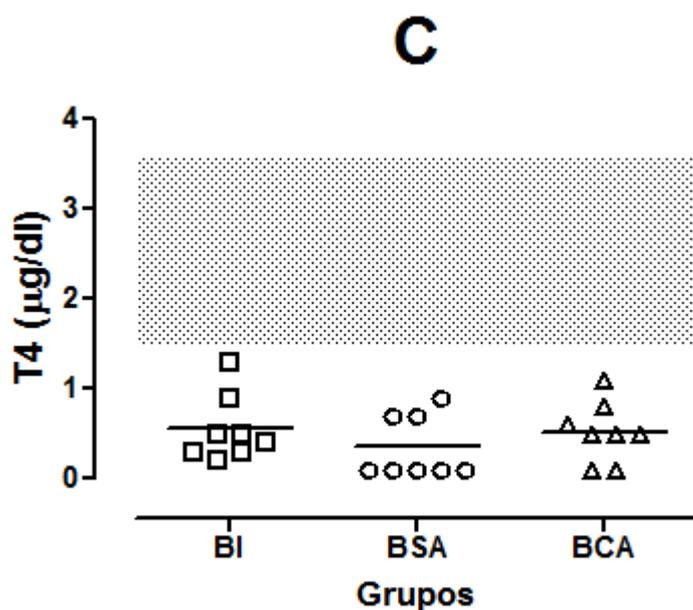


Figura 18. Níveis séricos de T<sub>4</sub> obtidos nas fêmeas nos três dias de avaliação em comparação com nível de T<sub>4</sub> basal descrito na literatura como referência para espécie (região pontilhada em cinza entre 1,5 - 3,6 µg/dL). Note os baixos níveis de T<sub>4</sub> encontrados no soro de todos os animais e a semelhança nas medias obtidas nos três dias diferentes de coleta. N = 8 fêmeas/grupo. Os dados representam os valores médios ± S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e P < 0,05.

### 6.1.3 Glicose

Os níveis de glicose basal são apresentados na figura 19 onde foram analisados 15 indivíduos, sendo sete machos e oito fêmeas e novamente conforme os dados apresentados anteriormente, foi observado uma uniformidade entre os indivíduos e também entre machos e fêmeas mostrando não haver diferença entre eles. Porém no comparativo com a literatura, os animais se mostraram quase que em sua totalidade com níveis glicêmicos abaixo do esperado levando em consideração valores entre 91 e 102 mg/dL (MEYER et al., 1995).

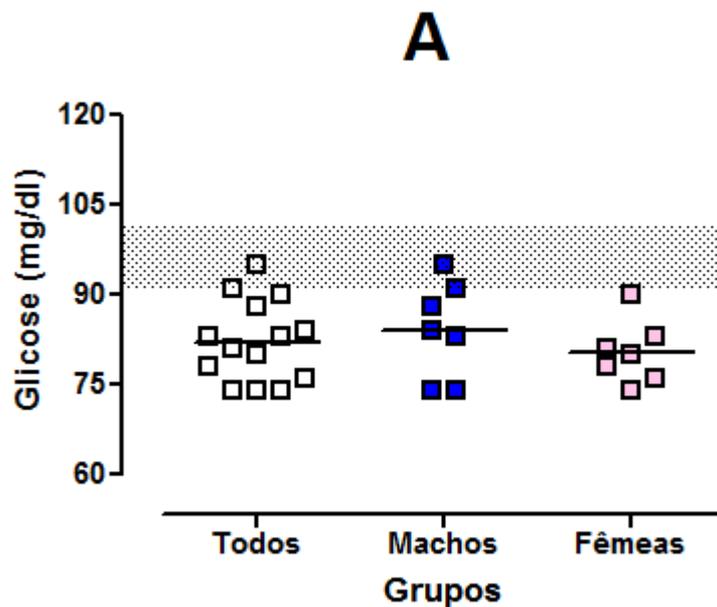


Figura 19: Níveis de glicose sanguínea em todos os animais (quadrados brancos), nos machos (quadrados azuis) e nas fêmeas (quadrados rosas). Note que a média dos valores glicêmicos basais se encontraram abaixo do descrito na literatura como referência para espécie (entre 91 e 102 mg/dL) demonstrado pela região pontilhada em cinza. N = 15 (7 machos e 8 fêmeas). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e  $P < 0,05$ .

#### 6.1.4 Lactato

Na análise dos níveis de lactato no sangue, demonstrada na Figura 20, observa-se que não houve diferença entre machos e fêmeas. Já em relação aos valores de normalidades descritos na literatura para espécie, os mesmos se encontraram acima dos valores de 0,22 - 1,44 mmol/L (KANEKO et al., 1997).

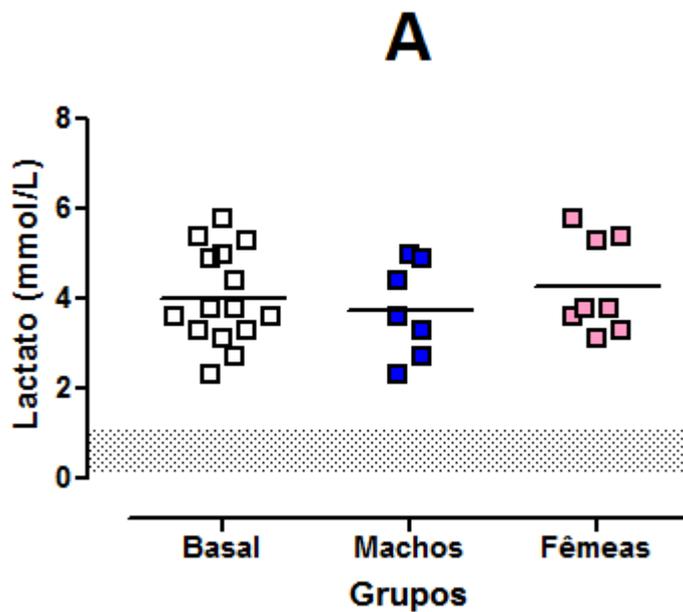


Figura 20: Níveis de lactato sanguíneo em todos os animais (quadrados brancos), nos machos (quadrados azuis) e nas fêmeas (quadrados rosas). Note que os níveis de lactato basais se apresentaram acima dos descritos na literatura como referência para espécie (entre 0,22 - 1,44 mmol/L) demonstrado pela região pontilhada em cinza. N = 15 (7 machos e 8 fêmeas). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e  $P < 0,05$ .

### 6.1.5 Colesterol

Os dados do colesterol apresentados na Figura 21 repetem a uniformidade dos demais resultados já descritos, tanto entre indivíduos quanto entre sexos, e novamente só quando comparados com os valores esperados é que observamos alterações, já que todos os animais apresentaram níveis de colesterol elevados em relação ao intervalo de 139 - 171 mg/dL (MEYER et al., 1995).

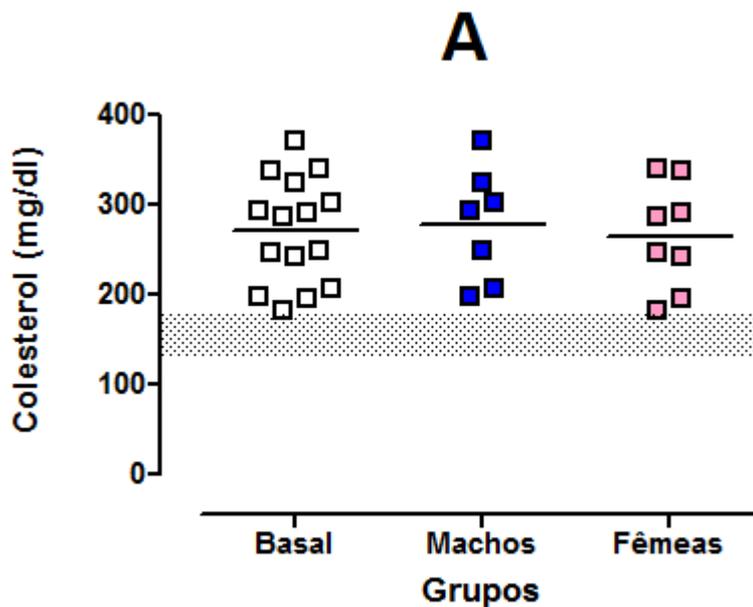


Figura: 21 Níveis de colesterol em todos os animais (quadrados brancos), nos machos (quadrados azuis) e nas fêmeas (quadrados rosas) e faixa de variação normal de colesterol basal descrito na literatura como referência para a espécie (entre 139-171 mg/dL) demonstrado pela região pontilhada em cinza. N= 15 (7 machos e 8 fêmeas). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e  $P < 0,05$ .

## 6.2 Avaliação em atividade comparativa entre os grupos AP e AB

Os dados apresentados abaixo mostram um gráfico comparativo das diferenças entre os grupos AP e AB durante as atividades, em três tempos diferentes: T0, T1 e T2 em cada um dos parâmetros já avaliados em condição basal. Devido a semelhança dos valores obtidos em todos os parâmetros observados entre machos e fêmeas, a partir de agora, todos os dados dos protocolos de atividade serão representados juntos para compor o mesmo grupo (machos e fêmeas) comparando as duas diferentes atividades: adestramento básico (AB) vs. ataque e proteção (AP), em função do tempo. Os resultados foram agrupados em ambos os sexos, pois em testes preliminares não apresentados, não houve diferença entre os sexos durante a atividade.

### 6.2.1 Cortisol

Na Figura 22, observa-se que o eixo HHA respondeu de maneira distinta aos paradigmas AP e AB. No grupo AP os níveis de cortisol foram semelhantes no T0 e T1, posteriormente no intervalo entre o T1 e T2 houve aumento altamente significativo ( $P < 0,01$ ) comparado aos valores basais (T0) e ao Grupo AB no T2. Já no grupo AB esse aumento ( $P < 0,05$ ) começou precocemente no intervalo entre T0 e T1, porém de forma mais discreta, atingindo pico inferior ao obtidos no grupo AP. Diferente do grupo AP, os níveis retornaram aos valores iniciais no T2 ( $P > 0,05$ ).

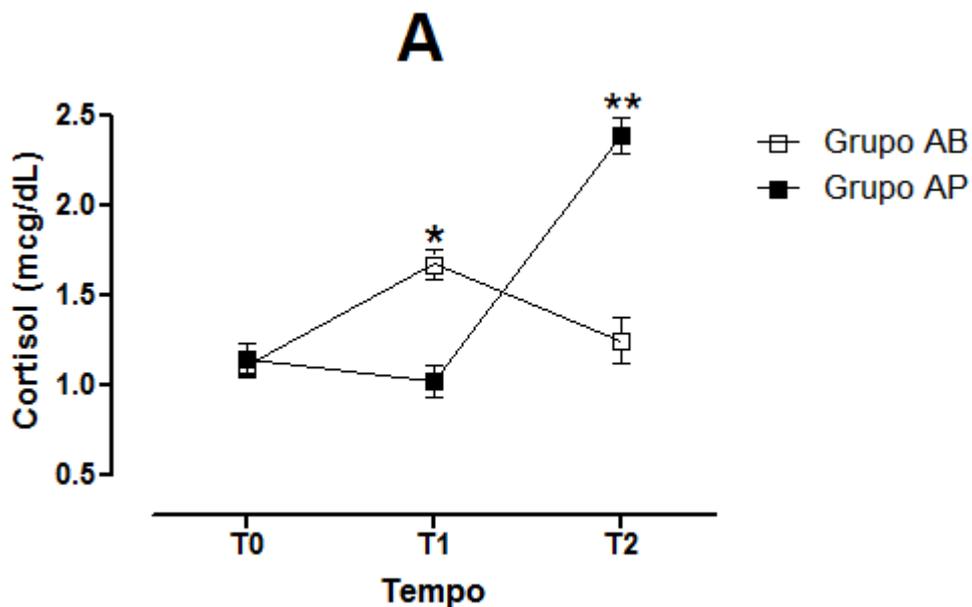


Figura 22: Níveis de cortisol durante a atividade em três tempos (T0 = antes do início da atividade, T1 = imediatamente após a atividade e T2 = após descanso de 30 minutos) e o comparativo entre os dois grupos (AP = ataque e proteção e AB = adestramento básico). N= 15 (7 machos e 8 fêmeas). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA bivariada seguido do *post test Bonferroni* e \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  vs. mesmo grupo no T0 ou ao outro grupo no mesmo tempo (T1 ou T2).

### 6.2.2 Glicose

A Figura 23 demonstra que, embora a glicemia pareça mais baixa apenas no grupo AB no T1 (comparando com o mesmo grupo no T0 e ao grupo AP no T1), isto não foi comprovado estatisticamente. Assim, todos os valores de glicemia obtidos em ambos os grupos não foram diferentes estatisticamente ao longo do período de observação.

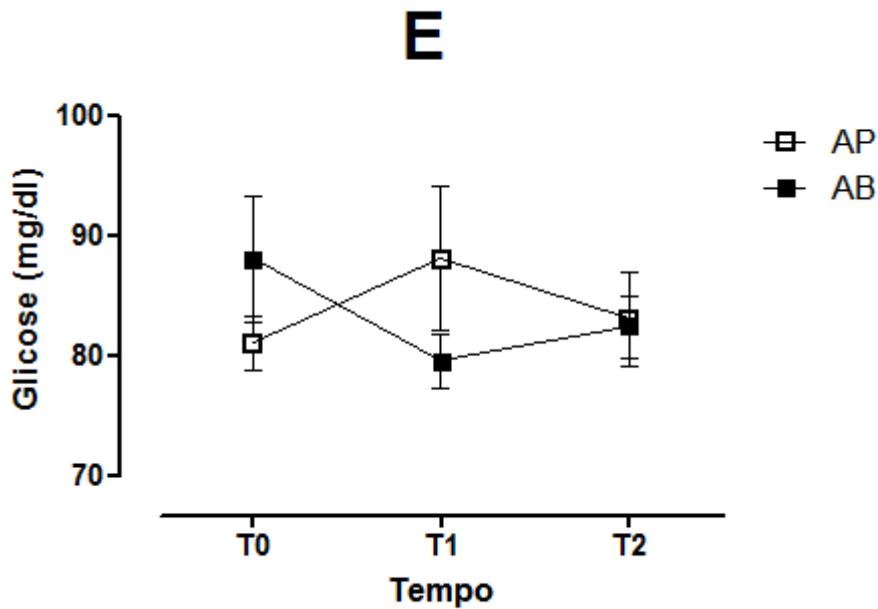


Figura 23: Glicemia medida durante a atividade em três tempos (T0 = antes do início da atividade, T1 = imediatamente após a atividade e T2 = após descanso de 30 minutos) e o comparativo entre os dois grupos (AP = ataque e proteção e AB = adestramento básico). N= 15 (7 machos e 8 fêmeas). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni* e  $P < 0,05$ .

### 6.2.3 Lactato

A resposta do lactato se diferenciou nos dois paradigmas como mostra a figura 24. Enquanto no paradigma AB, os níveis de lactato permaneceram praticamente inalterados durante os três tempos, no AP ocorreu aumento significativo no T1, retorno aos níveis de lactato basais no T2. Estes dados sugerem atividade de alto impacto no grupo AP e baixo impacto no AB.

## F

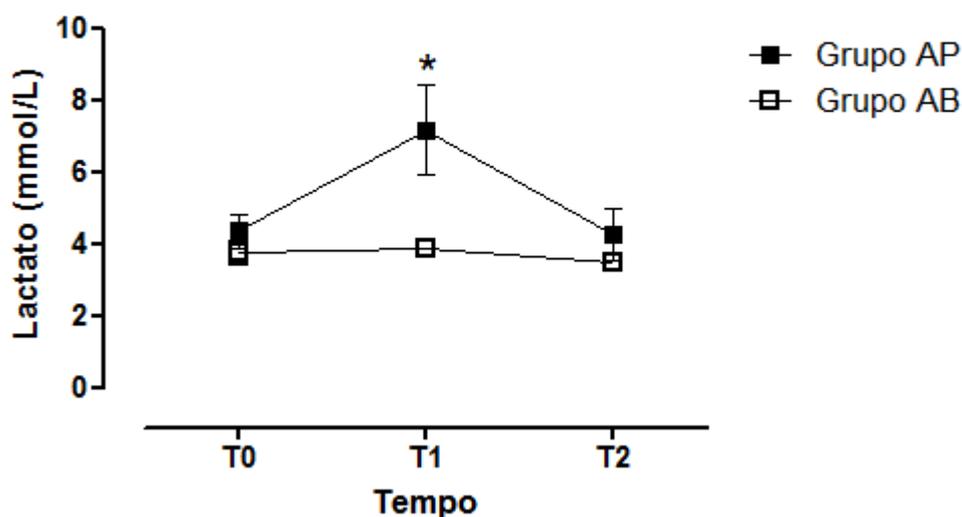


Figura 24: níveis de lactato sanguíneo durante a atividade em três tempos (T0= antes do início da atividade, T1= imediatamente após a atividade e T2 = após descanso de 30 minutos) e o comparativo entre os dois grupos (AP = ataque e proteção e AB = adestramento básico). N= 15 (7 machos e 8 fêmeas). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni*. \*P < 0,05 vs. mesmo grupo no T0 e ao grupo AB no T1 ou T2.

### 6.2.4 Eixo HHT

Diferente da resposta observada no eixo HHA, o eixo HHT respondeu de forma semelhante aos diferentes paradigmas AP e AB. Ao que se refere aos níveis de TSH apresentados na figura 25, embora pareçam mais elevados no paradigma AP, comparados ao AB, isto não foi demonstrado estatisticamente ( $P > 0,05$ ).

Em relação aos níveis de  $T_4$  apresentados na Figura 26, observou-se que nos dois paradigmas os níveis se mantêm muito semelhantes ao longo do tempo ( $P > 0,05$ ).

Curiosamente, em relação aos valores séricos de  $T_3$ , representados na Figura 27, observou-se diminuição significativa em seus níveis em ambos os grupos no T1. Esta queda se manteve apenas no grupo AP, tendo portanto, o grupo AB retornado aos valores basais ( $P > 0,05$ ) no T2.

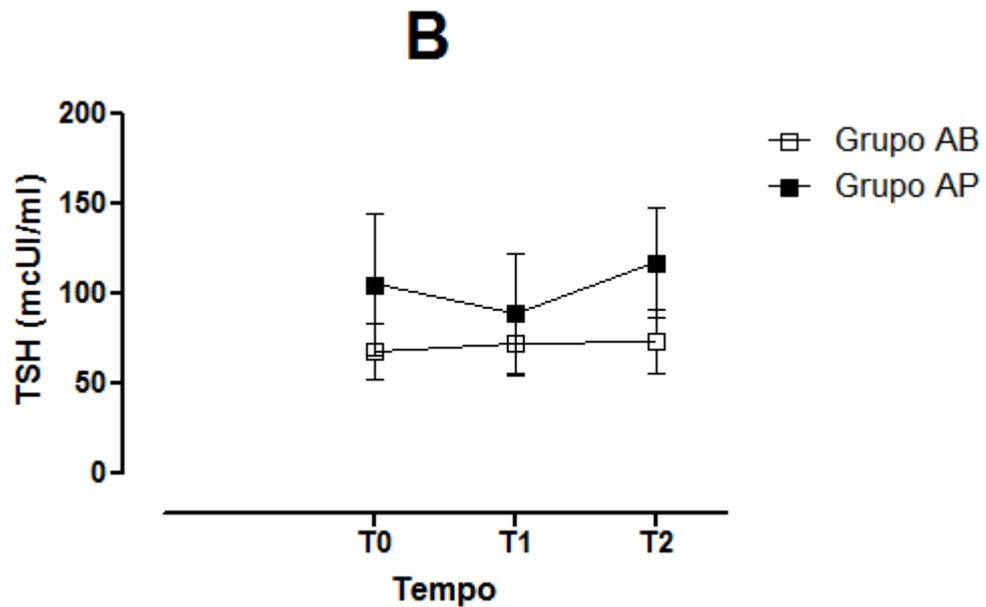


Figura 25: Níveis séricos de TSH durante a atividade em três tempos (T0 = antes do início da atividade, T1 = imediatamente após a atividade e T2 = após descanso de 30 minutos) e o comparativo entre os dois grupos (AP = ataque e proteção e AB = adestramento básico). N= 15 (7 machos e 8 fêmeas). Note que não houve diferença tanto entre os grupos como entre os tempos de observação ( $P > 0,05$ ). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni*.

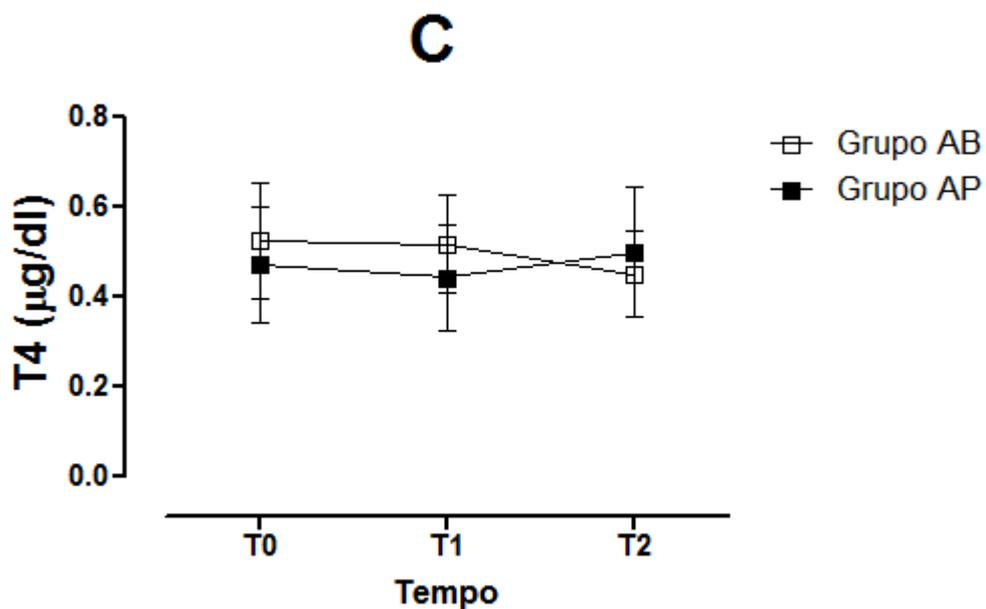


Figura 26: Níveis séricos de T4 durante a atividade em três tempos (T0 = antes do início da atividade, T1 = imediatamente após a atividade e T2 = após descanso de 30 minutos) e o comparativo entre os dois grupos (AP = ataque e proteção e AB = adestramento básico). N= 15 (7 machos e 8 fêmeas). Note que não houve diferença tanto entre os grupos como entre os tempos de observação ( $P > 0,05$ ). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni*.

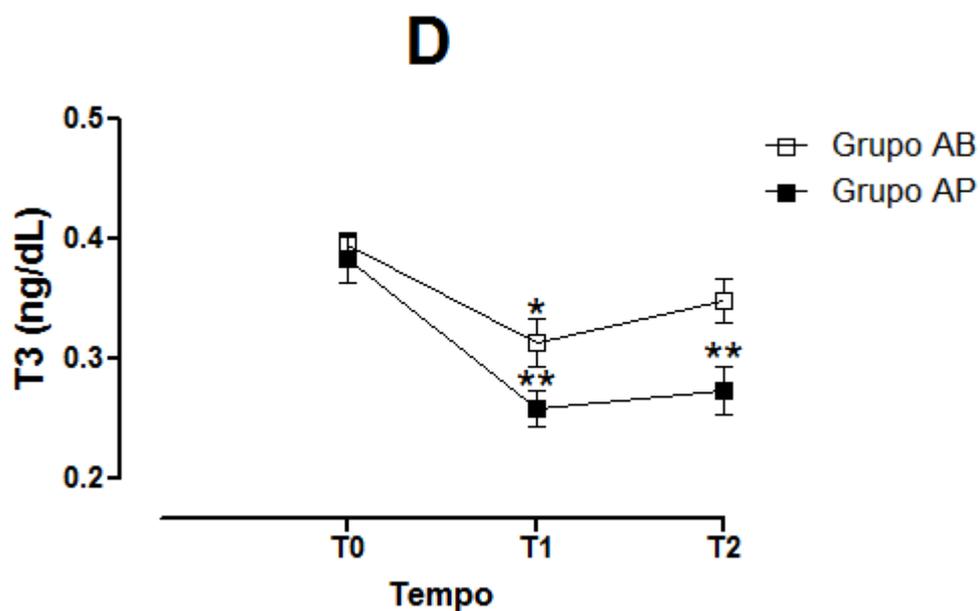


Figura 27: Níveis séricos de T3 durante a atividade em três tempos (T0 = antes do início da atividade, T1 = imediatamente após a atividade e T2 = após descanso de 30 minutos) e o comparativo entre os dois grupos (AP = ataque e proteção e AB = adestramento básico). N= 15 (7 machos e 8 fêmeas). Note a redução do T3 em ambos os grupos no T1, parecendo ser mais intensa no grupo AP, e a retomada aos valores basais apenas no grupo AB ( $P > 0,05$ ). Os dados representam os valores médios  $\pm$  S.E.M. Utilizou-se o teste ANOVA seguido do *post test Bonferroni*. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  vs. mesmo grupo no T0 ou em relação ao outro grupo no mesmo tempo (T1 ou T2).

## 7. DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi a constatação de que cães de policiamento mantidos em isolamento social e restrição espacial desenvolveram hipotireoidismo, diagnosticado diretamente por meio de dosagem sérica diminuída dos hormônios tireoidianos. Outros achados secundários, como hipercolesterolemia, também foram observados, o que fortalece a hipótese de distúrbio tireoidiano nesses animais. Surpreendentemente, o eixo hipotálamo-hipófise parece estar responsivo a queda de T3 e T4, uma vez que em todos os animais, houve hipertireotropinemia, caracterizando assim o hipotireoidismo primário. Isto parece incomum, pois, não há registros na literatura de distúrbio tireoidiano direto em resposta a estímulos estressores, seja clinicamente ou em nível experimental. Doenças secundárias parecem ser pouco prováveis uma vez que todos os animais foram submetidos a exame clínico geral para a pesquisa de possíveis alterações sistêmicas que pudessem compor critérios de exclusão dos animais deste estudo.

Embora o hipotireoidismo central, i.e., diminuição da estimulação hipotalâmica-hipofisária seja uma alteração frequente em qualquer doença grave (NELSON & COUTO, 2006) ou mesmo em situações de estresse crônico (Olivares et al. 2012), a alteração primária da tireoide em resposta a possível situação de estresse neste estudo não era esperada. Embora alteração da função tireoidiana já tenha sido descrita em modelos de estresse como estresse social não acreditamos que isto seja a principal explicação para os achados deste estudo. Desta forma, a interação entre os eixos hipotálamo-hipófise-tireoide (EHHT) e hipotálamo-hipófise-adrenal (EHHA) possa ser a principal razão do hipotireoidismo detectado neste estudo. Considerando que esses animais estejam sendo submetidos a estimulação crônica do EHHA, é provável que o hiperadrenocorticismos esteja bloqueando o EHHT e portanto sendo o responsável primário do hipotireoidismo. Pode-se especular também que, com a cronicidade da estimulação do EHHA, o sistema tenha se adaptado, adaptação esta sugerida aqui pelos níveis normais de cortisol plasmático basal, e conseqüentemente perdido a influência moduladora central do cortisol sobre o EHHT. Isto associado à perda de *feedback* negativo exercido pelos hormônios tireoidianos (hipotireoidismo), pode ter potencializado o estímulo hipotalâmico-hipofisário na secreção de TRH e TSH respectivamente. Esta hipótese é sustentada pela descrição de que o EHHA exerce influência negativa sobre o EHHT em vários modelos de estresse. Ao mesmo tempo, é claro que estudos utilizando o modelo de estresse

induzido pelo isolamento social e restrição espacial, bem como dosagens seriadas de hormônios tireoidianos e de cortisol em cães de policiamento em duas situações: antes e depois do confinamento/isolamento serão necessários para confirmar ou não esta hipótese.

Com base nos dados discutidos na literatura, partimos da premissa que possivelmente esses animais poderiam se encontrar sob condições de estresse, devido as suas condições de alojamento e manejo. Para avaliação de estresse preconiza-se principalmente avaliação do eixo HHA baseando-se nos níveis de cortisol. O eixo hipotálamo–hipófise–adrenal (HHA) é parte integrante de um sistema neuroendócrino que, de acordo com estímulos internos ou externos, sofre variações visando a manutenção da homeostase do meio interno. O controle hipotalâmico sobre a secreção hipofisária do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é multifatorial, sendo o hormônio liberador da corticotrofina (CRH) considerado o principal regulador fisiológico da secreção de ACTH. Outros fatores podem também modular a secreção de ACTH, como a vasopressina, angiotensina, ocitocina, catecolaminas e citocinas. O ACTH plasmático é o principal regulador da secreção de cortisol pelo o córtex da adrenal, porém outros hormônios, fatores ou citocinas, bem como a inervação do sistema nervoso autônomo do córtex da adrenal parecem participar da regulação da secreção do cortisol. Os neurônios parvocelulares que secretam CRH e vasopressina, juntamente com os neurônios catecolaminérgicos do *locus ceruleus* e outros grupamentos celulares da medula e ponte, constituem os principais reguladores centrais da resposta ao estresse, que ativam o eixo HHA e o sistema eferente simpático da medula adrenal (ELIAS & CASTRO, 2005).

O eixo HHA é ativado por diferentes tipos de estresse como, traumático, inflamatório ou psicológico. Em diferentes modelos experimentais, observa-se que vários paradigmas de estresse induzem a ativação dos neurônios parvocelulares que secretam CRH, entre os quais podemos citar: sobrecarga salina, hipoglicemia, imobilização, jejum, exposição ao éter e administração de citocinas. A magnitude da resposta do ACTH e cortisol ao estresse depende de vários fatores, dentre os quais se destacam a natureza do estresse, intensidade, rapidez de aparecimento, a associação com outro estresse e o tempo de exposição. Durante o estresse, há aumento da secreção de CRH e vasopressina, que resulta na secreção aumentada de ACTH e cortisol. O CRH é um dos neuropeptídeos responsáveis pela integração do processo de resposta adaptativa ao estresse, não só como mediador da ativação do eixo HHA, mas também

como mediador das respostas autonômica, comportamental e imune (CARRASCO & KAR, 2003).

Outros fatores são recrutados durante diferentes tipos de estresse, potencializando a ação do eixo HHA, entre os quais a angiotensina II, citocinas e outros mediadores da inflamação. Exercícios físicos também podem estimular a secreção de ACTH e cortisol cuja resposta tem relação com a intensidade e o grau de treinamento físico. O ACTH é o principal regulador da secreção de glicocorticoide pelo córtex da adrenal. Porém, outros hormônios ou citocinas presentes na circulação sistêmica ou liberados pela medula adrenal, bem como informações neuronais via inervação autonômica do córtex adrenal, podem também participar da secreção do cortisol. Os glicocorticoides são os efetores terminais do eixo HHA e participam do controle da homeostase do organismo frente ao estresse, tendo papel preponderante no término da resposta do eixo HHA, exercendo a regulação contra negativa a nível hipotalâmico e hipofisário. A interrupção desse mecanismo de contra regulação negativa tem sido implicada na fisiopatologia de alguns distúrbios, como a depressão, e resulta em concentrações elevadas de glicocorticoide. O efeito inibitório do glicocorticoide sobre a secreção de ACTH limita a exposição prolongada dos tecidos aos glicocorticoides, minimizando os efeitos catábolos, anti-reprodutivos e imunossupressivos desses hormônios (ELIAS & CASTRO, 2005).

Assim o estresse agudo ou crônico estimula diretamente o eixo HHA, resultando em aumento das secreções dos hormônios oriundos desse eixo, como o CRH, a vasopressina, o ACTH e o cortisol, com conseqüente elevação dos mesmos no plasma sanguíneo.

Estudo realizado por Beerda et al., (1999b) a fim de caracterizar estresse crônico em cães, os mesmos foram submetidos ao estresse de isolamento social e restrição espacial por um período de aproximadamente seis semanas. Tal experimento se mostrou eficaz, pois os animais apresentaram ao final do experimento sinais claros de estresse, tanto em parâmetros hormonais, como elevados níveis de cortisol como quanto parâmetros comportamentais (BEERDA, et al., 1999a) apresentando estereotípicas clássicas de estresse. Contrariando estes dados, nossos cães apesar de se encontrarem em isolamento social e restrição espacial, pois este é o manejo preconizado para cães de policiamento do exército, os mesmos apresentaram níveis de cortisol em condições basais dentro dos valores esperados para espécie, embora próximos aos valores mínimos. Dado semelhante também foi encontrado por Haverbeke *et al.*, (2008), que também utilizou três coletas de um mesmo animal para obtenção de dados

basais confiáveis, tal procedimento se mostrou eficiente tanto em seu estudo, quanto no nosso. As diferenças entre os resultados no estudo realizado por Beerda et al., (1999b) e nosso, talvez se deva ao fato de que nossos animais se encontram sob condições de isolamento e restrição por no mínimo três anos enquanto o grupo de Beerda acompanhou os animais por apenas algumas semanas. Os animais do grupo de Havebeke já se encontravam sob condição de isolamento e restrição também por um longo período, talvez por isso haja semelhanças em nossos dados basais. Estes achados em conjunto sustentam a hipótese de que os animais utilizados neste estudo estivessem sob adaptação ao estresse crônico.

Hannessy et al., (1997) em um estudo realizado com cães de abrigo que são submetidos a condições semelhantes de isolamento e restrição, concluíram que o período crucial para o desenvolvimento do aumento nos níveis de cortisol plasmáticos desses animais, são os primeiros dias de exposição ao ambiente. Dado que também pode explicar os níveis de cortisol normais de nossos animais.

Outro aspecto relevante do nosso estudo foi a constatação de que o dimorfismo sexual não apresenta fator importante na resposta ao estresse crônico em nossos animais. Hannessy et al. (1997) também estudaram este fator e mostraram não haver diferenças significativas entre machos e fêmeas, o que vem a corroborar nossos dados que se mostraram uniformes em todos os parâmetros avaliados em relação ao sexo. O dimorfismo sexual em relação aos níveis de cortisol também não foi observado em um estudo com cães de policiamento do Exército Belga. Porém, os animais avaliados apresentaram níveis de cortisol basal acima dos valores esperados para espécie, em contra partida esses níveis elevados passaram a se enquadrar nos valores de normalidade depois que esses animais foram submetidos a uma rotina regular de práticas de atividades em companhia de seus condutores. O estudo sugeriu que o bem estar de cães de canis, principalmente militares, está diretamente relacionado a rotina de exercícios e contato humano (LEFEBVRE et al., 2009). Isto reforça o fato que a interação social tem efeitos benéficos para bem estar físico e emocional do animal, podendo assim o isolamento social ser um importante indutor de estresse.

Além de não termos encontrado dimorfismo sexual em relação aos níveis de cortisol, as coletas alternadas utilizadas para obtenção dos dados basais, também mostraram não haver diferenças nos níveis dos mesmos em relação aos diferentes dias, ou seja os animais realizando ou não atividade naquele dia. Portanto, seus dados basais não foram influenciados por uma possível homeostase preditiva em relação à atividade.

Hannessy et al., (1997) também observaram que a coleta de material através da venopunção da cefálica parece não afetar os níveis de cortisol, pois acreditam que o procedimento não demande tempo suficiente para que isso ocorra. Com base em nossos dados também compartilhamos da mesma opinião.

Ainda em relação aos dados basais de cortisol, Rooney et al., (2007), avaliaram dois grupos distintos de cães: (1) os animais já haviam passado por experiência prévia em um canil de isolamento e restrição; (2) os animais não possuíam experiência prévia em canis de isolamento e restrição. Quando introduzidos em canis, os dados basais de cortisol desses animais foram avaliados e os mesmos refletiram que os cães podem carregar uma memória fisiológica e emocional de experiência anterior, que irão ajudar o animal em novas exposições futuras a condições adversas, pois os animais já experientes embora tenham apresentado elevações nos níveis de cortisol desde o primeiro dia no canil, seus níveis de aumento eram significativamente menores que os níveis apresentados pelos animais que nunca tinham estado em um canil. Outro fato observado foi que os animais já experientes, tiveram seus níveis de cortisol normalizados em 10 dias, o que não ocorreu com os animais não experientes. Neste estudo temos as experiências passadas e capacidade cognitiva do animal, modulando a resposta fisiológica a um complexo e relevante estressor específico.

Em um estudo muito semelhante, porém realizado com cães efetivamente pertencentes a abrigos de acolhimento, foi feito um comparativo entre animais que já haviam passado por experiências anteriores em abrigos e animais que nunca haviam passado por tal experiência, e foi demonstrado corroborando os dados anteriores, que os animais experientes embora tenham demonstrado aumento nos níveis de cortisol nos primeiros dias de estadia, esses níveis foram diminuindo ao longo de 10 dias, fato que não ocorreu com o grupo não experiente, pois o mesmo manteve níveis de cortisol aumentados ao longo dos 10 dias. O grupo sugeriu então que animais com experiências prévias se tornam mais adaptados mediante a uma nova exposição, mostrando que embora o estresse ocorra como demonstrado pelos altos níveis de cortisol, os desdobramentos posteriores mostraram que estes animais estão mais preparados para lidar com o isolamento social e restrição espacial tendo descoberto medidas adaptativas durante sua estadia anterior (HIBY et al., 2006).

A discussão destes resultados pode ter significativa relevância em relação aos dados dos nossos animais, pois os mesmo podem sim ter desenvolvido um mecanismo de adaptação em resposta ao seu ambiente social e espacial. Dessa forma é sugestivo que as respostas a um

estímulo estressor podem ser diferenciadas de acordo com experiências prévias, mostrando que um possível estresse crônico não deve ser avaliado somente com parâmetros explícitos de estresse agudo.

Embora as mudanças no eixo HHA sejam normalmente estabelecidas pela medida de cortisol que tendem a se mostrarem elevados, a adaptação ao estresse em situações de estresse crônico pode contrariar as respostas de estresse inicial e tornar parâmetros de estresse agudo inúteis na avaliação de estresse crônico, por isso vários parâmetros fisiológicos e comportamentais devem ser avaliados de forma cuidadosa (BEERDA *et al.*, 1997).

Em uma discussão adicional observamos que os parâmetros comportamentais são de grande relevância para avaliação do estresse nesses animais, embora neste estudo tais parâmetros tenham sido observados de forma informal, ou seja não avaliados quantitativamente e qualitativamente, apenas por uma observação visual durante o convívio com estes animais, ficou claro que os mesmos apresentavam sinais de estereotípias clássicas, que corroboram com dados já publicados.

Estudos mostram que más condições de habitação para cães induzem alterações de comportamento, como aumento no ato de se limpar, aumento da manipulação do ambiente e de movimentos repetitivos (HEETS *et al.*, 1992; HUBRETCH *et al.*, 1992). Ainda segundo Heets *et al.* (1992), cães submetidos a isolamento social passam a maior parte do tempo em movimento e exibindo um maior número de comportamentos estranhos.

Segundo Walker *et al.* (2009), cães submetidos ao confinamento em ambientes pobres e pequenos, durante um longo período apresentam sinais de ansiedade e estresse como andar em círculos e postura de lamentação.

Estudos realizados em cães por Beerda *et al.* (1999a) mostram que os principais sinais de estresse crônico induzido por isolamento social e restrição espacial são um aumento na frequência do ato de se limpar, de andar em círculo, de comer fezes, de levantar a pata, do ato de suspirar e nas vocalizações. Os cães também apresentaram baixa postura, sentaram-se mais e caminharam menos. Houve também diminuição no ato de cavar, de se apresentarem ofegantes e na intenção de mudar de um estado de locomoção para o outro. Dentre estes sinais há aumento significativo e considerável no ato de se limpar, no levantamento da pata e nas vocalizações, por isso podem ser considerados parâmetros úteis na identificação do estresse crônico.

Em situações de estresse mais severo pode induzir os cães a realizarem comportamentos de termorregulação como aumento de salivação, respiração ofegante e anti – diurese (BEERDA, *et al.*, 1997).

Outras alterações de comportamento em cães com restrição espacial e social foram descritas por Spangenberg *et al.* (2006), como o ato de ficar de pé na duas patas traseiras apoiando-se no muro ou grade, saltando e movimentando-se e repetindo este movimento por várias vezes. Foi observado ainda aumento na postura de dominância quando visualizavam outros cães, evidenciando a agressividade. Assim, algumas alterações de comportamento são observadas apenas quando os cães estão diante de um desafio, mas que ainda assim devem ser levadas em consideração (BEERDA *et al.*, 1999 a). Já foi descrito que não somente o tamanho e o tipo de ambiente ou se é enriquecido ou não, que alteram o comportamento dos cães. O isolamento social, por si, é suficiente para levar a essas alterações (SPANGENBERG *et al.*, 2006).

Mesmo diante de tais manifestações, curiosamente as alterações comportamentais ainda não estão bem correlacionadas com os níveis de cortisol (HAVERBEKE *et al.*, 2008), embora haja uma relação entre elas.

O eixo HHA, quando avaliado diante dos paradigmas AP e AB, se mostrou responsivo no comparativo com os dados basais. No paradigma AP, podemos observar que não houve diferença entre o intervalo T0 e T1, porém posteriormente entre o intervalo T1 e T2 houve o aumento altamente significativo. Já no paradigma AB, o aumento se tornou visível ainda no intervalo T0 e T1, com posterior declínio no intervalo T1 e T2, retornando assim aos seus valores iniciais. Concluímos então que embora no paradigma AP o aumento nos níveis de cortisol durante atividade tenha sido retardado em relação ao AB, os mesmos atingiram níveis significativamente mais elevados quando comparados ao AB, em contra partida devido ao protocolo adotado para o experimento não foi possível observar seu declínio, como ocorreu com AB que acompanhamos sua curva de ascensão e posterior declínio.

Nossos dados não se diferem dos dados encontrados no estudo de Radosevich *et al.* (1989), onde grupos de cães foram submetidos a distintos protocolos de atividade, e foi constatado aumento nos níveis de cortisol também de maneira diferenciada, estando os níveis de aumento de cortisol diretamente relacionado com a intensidade e a duração atividade experimental. Também se assemelham os dados obtidos por Armario *et al.* (1996), onde o cortisol se mostrou um importante marcador de estresse em condições de ansiedade.

Por outro lado, os dados de Haverbeke et al. (2008) discordam dos anteriores. Neste estudo, em um primeiro momento os cães militares foram submetidos a diferentes desafios (social, treinamento, estímulo visual e sonoro), como esperado nesta primeira experiência os animais apresentaram aumento em seus níveis de cortisol no comparativo com seus próprios valores basais, que retornaram para normalidade inicial em média dentro de 15 dias. Posteriormente, os mesmos animais foram submetidos novamente aos mesmos desafios e curiosamente os animais não mais apresentaram respostas em relação aos níveis de cortisol, o fato foi atribuído a um possível reconhecimento e adaptação aos desafios apresentados. Também foi concluído que estes cães não estariam estressados cronicamente, pois após o desafio seus níveis de cortisol regressam aos valores iniciais que se enquadram nos valores esperados para a espécie. Porém foi avaliado que os mesmos indivíduos apresentam estereotípias clássicas de estresse, mas que não foram consideradas devido à falta de correlação com os altos níveis de cortisol. Os nossos cães mesmo estando habituados aos desafios que lhes foram apresentados durante o experimento, pois fazem parte da sua rotina de treinamento por pelo menos 2 - 3 anos, ainda assim apresentaram respostas significativas quando desafiados, embora de forma diferente quando comparamos AB a AP. A retomada aos valores basais no AB após o desafio corrobora com os outros estudos (HAVERBEKE et al., 2008), sugerindo que os valores basais de cortisol dos nossos animais não refletem indícios de estresse até onde temos conhecimento. Vale ressaltar que, embora os desafios de trabalho tenham elicitado respostas secretórias de cortisol, em ambas as situações os valores de pico (T1 no AB e T2 no AP) não ultrapassaram os valores considerados normais para espécie (Figura 22). Isto sugere possível adaptação às atividades cotidianas de trabalho nesses animais.

Portanto, é possível que os animais deste estudo estejam sendo submetidos ao estresse crônico, porém com uma possível adaptação ou esgotamento do eixo HHA no que se refere aos níveis de cortisol, em manter uma resposta ao estresse por período muito longo. Para tanto também nos baseamos nos dados comportamentais indiretamente observados, e nos dados obtidos pela avaliação do eixo HHT que serão discutidos a partir de agora.

Por ainda haver divergências na avaliação de estresse crônico, e buscando um maior embasamento e confiabilidade dos nossos dados, avaliações de outra alça neuroendócrina não classicamente estudada, mas que se mostraram úteis no estabelecimento de um diagnóstico

mais fidedigno, sobretudo em animais submetidos ao estresse crônico. Abordamos então o eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireoide (HHT).

O Hormônio Liberador da Tireotrofina (TRH) é expresso em neurônios parvicelulares dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, sendo armazenado nos axônios e liberado sob condições específicas, ao sistema porta hipotálamo-hipofisário, participando assim, da regulação da atividade tireotrófica. O TRH atua nos tireotrofos da glândula hipófise estimulando a transcrição gênica e a secreção do hormônio tireotrófico ou tireotrofina (TSH). O TSH é sintetizado e secretado pelos tireotrofos na hipófise e ele é o principal regulador do crescimento e da função da glândula tireoide, interagindo com receptores presentes na membrana da célula folicular tireoidiana, estimulando a expressão de proteínas envolvidas na indução de seus efeitos proliferativos e na biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos (NUNES, 2008).

Os principais reguladores da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide são os próprios hormônios tireoidianos que atuam no hipotálamo e hipófise, modulando tanto a síntese quanto a secreção nas diferentes situações fisiológicas. Esse mecanismo é conhecido como retroalimentação negativa, ou *feedback* negativo e implica na compreensão de que os hormônios tireoidianos, mesmo em concentrações fisiológicas, exercem uma ação tônica inibitória sobre a síntese e a secreção de Somatostatina (SS), de modo a garantir que a sua secreção basal seja mantida. Assim em baixas concentrações plasmáticas, tanto seu efeito inibitório sobre o TRH e TSH quanto o seu efeito estimulante sobre a SS ficam reduzidas, o que causa maior liberação de TRH e TSH, estimulação da atividade tireoidiana e elevação da taxa de seus hormônios na circulação. O contrário ocorre quando eles se apresentam em altas concentrações plasmáticas, situação em que haverá maior inibição do TRH e TSH e maior estimulação da SS, efeitos que em conjunto reduzem a atividade tireoidiana e a concentração plasmática de seus hormônios. Fatores capazes de alterar a atividade do eixo, como temperatura e luz ambiente, estado alimentar e estresse, levam a ajustes homeostáticos que confirmam a importante função desse sistema na regulação da temperatura corporal, no metabolismo energético e no estresse (NUNES, 2008).

O mesmo protocolo utilizado para obtenção dos valores basais de cortisol também foi utilizado para obtenção dos valores basais dos níveis de TSH, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> a fim de caracterizar a condição basal do eixo HHT desses animais. Os resultados dessas avaliações mostraram acompanhar os dados do cortisol em relação a sua uniformidade entre os dias de avaliação e

entre os sexos. Concluindo não haver interferência do dia nos valores basais e também não demonstrando dimorfismo sexual.

Porem diferente da normalidade encontrada no eixo HHA, o eixo HHT se mostrou bastante alterado em seus valores basais no comparativo com os valores esperados para espécie. Todos os animais apresentaram níveis de TSH significativamente aumentados, em contrapartida níveis de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> significativamente diminuídos, caracterizando assim um quadro claro de hipotireoidismo primário, como discutido no início desta sessão.

Em relação aos paradigmas de desafios apresentados, diferente da resposta observada no eixo HHA, o eixo HHT respondeu de forma semelhante aos diferentes paradigmas AP e AB. Ao que se refere aos níveis de TSH, embora pareçam mais elevados no paradigma AP, comparados ao AB, isto não foi demonstrado estatisticamente ( $P > 0,05$ ). Em relação aos níveis de T<sub>4</sub> observou-se que nos dois paradigmas os níveis se mantem muito semelhantes ao longo do tempo. Curiosamente, em relação aos valores séricos de T<sub>3</sub>, observou-se diminuição significativa em seus níveis em ambos os grupos no T1. Esta queda se manteve apenas no grupo AP, tendo portanto, o grupo AB retornado aos valores basais no T2.

Não foram encontrados na literatura dados da avaliação do HHT, em cães durante a atividade para que pudéssemos discutir no comparativo com nossos. Ao mesmo tempo que isto limita nossa discussão, serve de alerta para a necessidade de desenvolvimento de mais estudos para a investigação do EHHT em cães, especialmente aqueles submetido a paradigmas de estresse. Considerando a importância desta alça neuroendócrina, acreditamos que estudos deste tipo podem fornecer substratos mais consistentes para uma avaliação mais racional do estresse em cães.

Com base nos diagnósticos de hipotireoidismo e nos dados referentes ao cortisol discutidos acima, desenvolvemos a hipótese de que no momento da inserção desses animais no ambiente de restrição e isolamento, os mesmos possivelmente desenvolveram um quadro de estresse agudo, apresentando altos níveis de cortisol, que por sua vez teria exercido uma modulação negativa no EHHT, levando a baixos níveis de TSH, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, por consequência causando hipotireoidismo central nesses animais.

Esta relação entre o EHHA e o EHHT já é conhecida há muito tempo, como por exemplo, os estudos de Ingbar & Freninkel, (1955), onde a relação do eixo EHHT e os corticoides foi investigada. Neste estudo, conclui-se que as ações dos glicocorticoides nos hormônios tireoidianos não eram de origem periférica como se acreditava, mas também não

conseguiram elucidar se os efeitos seriam diretamente relacionados a hipófise ou a tireoide. Já em 1969, Wilber e Utiger realizaram um estudo para observar a relação direta entre os glicocorticoides e a secreção de TSH, para isso utilizaram dois experimentos sendo um em humanos e outro em ratos, ambos contendo indivíduos saudáveis e indivíduos portadores de hipotireoidismo. O resultado encontrado foi semelhante tanto entre humanos e ratos, quanto entre indivíduos portadores de hipotireoidismo e indivíduos saudáveis. O experimento consistiu na avaliação dos níveis de TSH antes e depois da administração de dexametasona, e foi observada diminuição significativa nos níveis de TSH depois da exposição a altas concentrações de glicocorticoides. Também se observou que os níveis de TSH voltaram aos valores iniciais de 24-48 horas após a administração. Fato que pode se assemelhar fortemente ao ocorrido em nossos animais. Assim, com níveis de cortisol dentro da normalidade, o TSH dos cães em nosso estudo responde de forma acentuada as baixas concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos, revelando que se em algum momento o eixo HHT esteve sob supressão, a mesma foi totalmente revertida.

Segundo publicação recente do nosso grupo (Olivares *et al.*, 2012), há uma relação direta entre o estresse e a função tireoidiana. Desta forma, a resposta ao estresse pelo eixo HHT pode variar consideravelmente em relação ao tipo de estressor e o tempo de exposição ao mesmo, podendo ocorrer desde inibição e estimulação como o eixo permanecer inalterado, até mesmo as três respostas podem ser encontradas em estágios temporais diferentes como uma estimulação inicial seguida por inibição. Neste trabalho, verificou-se que ratos submetidos a estresse social crônico, pelo paradigma residente-intruso, se mostraram hipotireoideos nas primeiras semanas e o tratamento com antidepressivo foi parcialmente eficaz em prevenir tal alteração (OLIVARES *et al.* 2012). Isto sugere que o eixo HHT tem importante papel no estresse e que os mecanismos que desencadeiam tais alterações precisam ainda ser mais bem explorados. O hipotireoidismo apresentado por estes animais nas primeiras semanas quando foram submetidos ao estresse social, sustenta a hipótese de que isto tenha ocorrido neste estudo com os cães no seu período inicial de inserção ao ambiente de isolamento e restrição.

Outro dado interessante apresentado recentemente é o de que cães tratados experimentalmente com glicocorticoides exógenos demonstraram uma significativa queda em seus níveis plasmáticos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, relacionado possivelmente com a supressão do eixo HHT pelos glicocorticoides administrados (GOTTSCHALK *et al.*, 2011).

Atualmente, não temos argumentos fisiológicas consistentes para explicar a queda de T3 nos cães submetidos aos dois paradigmas de trabalho (AB e AP). No entanto, pode-se especular que de alguma forma, a intensidade das tarefas de trabalho destes animais tenha influenciado diretamente o nível de queda do T3, uma vez que no AP a queda foi mais evidente e sustentada do que no AB. Portanto é inevitável novamente buscar explicações no EHHA em trabalhos publicados na literatura. Acreditamos que os níveis mais elevados de cortisol apresentado no AP podem ter influenciado agudamente os níveis de T3, i.e, ter diminuído mais intensamente seus níveis. Sem descartar os efeitos centrais dos glicocorticoides sobre o EHHT, é possível que de alguma forma o cortisol esteja aumentando o *clearance* de T3 (e não de T4, devido a sua elevada meia-vida e assim diminuindo seus níveis séricos. A maior capacidade de *clearance* dos hormônios tireoidianos (HTs) foi verificada em um estudo após a injeção de T3 marcado com iodo radioativo. O grupo de atletas em treinamento para triatlon (prova que envolve natação, corrida e ciclismo) apresentou maior taxa de desaparecimento do T3 radioativo (RONE et al., 1992). Paralelamente, é possível que deva existir nesta condição, maior utilização dos HTs pelos tecidos, por exemplo, pela maior expressão dos transportadores dos HTs como o MCT8 no músculo esquelético. Esta hipótese ainda não foi testada na literatura. Sendo assim, a literatura discute dois mecanismos principais para explicar a diminuição tardia dos HTs após o exercício:

1. Maior utilização pelos tecidos periféricos ou
2. Diminuição na conversão de T4 a T3.

Em relação ao primeiro mecanismo, já é bem descrito que diversas proteínas musculares são alvo dos HT, tais como a cadeia pesada da miosina (MHC), a cálcio ATPase de membrana sarcoplasmática (SERCA), a proteína desacopladora-3 (UCP-3) e o PCG-1 $\alpha$  (fator co-ativador de peroxissomo alfa) (SIMONIDES & VAN HARDEVELD, 2008). Sendo assim, dados recentes mostram que a atividade da D2 no músculo aumenta após o exercício e que esse aumento nos níveis locais de T3 seria importante para aumentar a expressão dos genes citados acima após o exercício e consequentemente promover as adaptações musculares.

Mais recentemente, o estudo de Dentice et al (2010) mostrou a importância da conversão local de T4 a T3 para induzir a transcrição de genes regulados por hormônios tireoidianos que são fundamentais para a diferenciação muscular. Utilizando animais que não

expressam D2 (Knock out – KO), eles observaram que o músculo adulto apresentava reduzida expressão de fatores regulatórios de músculo (MyoD e myogenina) e aumento na expressão de SERCA-2 que é regulada negativamente por T3, mostrando que a D2 muscular exerce um papel importante na regulação do *status* tireóideo no tecido e que durante o desenvolvimento e diferenciação celular a via de sinalização FOXO-3 parece ser a responsável pelo aumento na expressão e atividade da D2. Esses resultados demonstram claramente que a expressão de proteínas específicas do músculo esquelético é dependente da ativação da D2 e consequente ação dos HT (DENTICE et al., 2010).

Em relação à outra hipótese, a da piora na conversão tecidual de T4 em T3, isto se sustenta pelo conhecimento de que: ocorre aumento dos níveis de glicocorticoides após o exercício, tanto em seres humanos (HUANG et al., 2004) quanto nos animais após a sessão de corrida (FORTUNATO et al., 2008), i.e, o aumento dos níveis de glicocorticoides modulam a resposta ao estresse e podem ocasionar diminuição da atividade da D1 (desiodase responsável pela conversão/ativação de T4 em T3) hepática e consequentemente dos níveis de T3 (BIANCO et al., 1987). Motivados por essas evidências, pesquisadores utilizaram um modelo animal que não apresentasse elevação de corticosterona induzida pelo exercício. A administração de metirapona (um inibidor da síntese de corticoide) foi eficaz em impedir o aumento nos níveis de corticosterona após o exercício em ratos, mas não impediu a diminuição, de aproximadamente 20%, nos níveis de T3, 30 minutos após o exercício. Observou-se ainda neste estudo diminuição da atividade da D1 hepática 30 minutos após o exercício somente no grupo que não apresentou elevação nos níveis de corticosterona, indicando que o pico de corticosterona é importante para manter a atividade D1 normal após o exercício (LOUZADA-NETO, 2011).

Estes dados em conjunto sugerem que, possivelmente, a falta de um pico importante de cortisol nos cães neste estudo (adaptação) pode ter impedido a sustentação de uma atividade da D1 normal e consequentemente ter diminuído a conversão de T4 em T3 nos cães submetidos tanto ao AB como ao AP, sendo mais intenso neste último grupo.

Com a finalidade de dar maior sustentação aos resultados obtidos, outros parâmetros diretamente relacionados com as alças neuroendócrinas estudadas também foram avaliados.

O eixo HHA com base nos níveis de cortisol, também foi avaliado em relação aos níveis glicêmicos, pois o cortisol é conhecido por ser um hormônio hiperglicemiante. Assim, o cortisol é capaz de atuar tanto aumentando a gliconeogênese quanto reduzindo a utilização

celular da glicose. O estímulo a gliconeogênese se dá de duas formas: o cortisol aumenta as enzimas necessárias para conversão de aminoácidos em glicose pelas células hepáticas e também provoca mobilização de aminoácidos a partir de tecidos extrahepáticos principalmente dos músculos, dessa forma mais aminoácidos são disponibilizados no plasma para entrar em processo de gliconeogênese pelo fígado e portanto promover a formação de glicose. Tanto o aumento da taxa de gliconeogênese quanto a redução moderada na velocidade de utilização da glicose pelas células irão provocar elevação da concentração da glicose sanguínea. Esta elevação por sua vez provoca a estimulação da secreção de insulina, no entanto os maiores níveis plasmáticos de insulina não são tão efetivos na manutenção dos níveis plasmáticos de glicose como ocorre em condições normais. Por motivos ainda não inteiramente compreendidos, os altos níveis de glicocorticoides reduzem a sensibilidade de muitos tecidos, especialmente músculo esquelético e tecido adiposo, aos efeitos estimulantes da insulina sobre a captação e utilização da glicose (GUYTON & HALL, 2006). Assim o acompanhamento dos níveis plasmáticos da glicose juntamente com o cortisol poderia auxiliar na identificação do estresse.

Os resultados basais dos níveis de glicose evidenciaram novamente conforme os dados apresentados anteriormente, uma uniformidade entre os indivíduos e também entre machos e fêmeas mostrando não haver diferença entre eles. Porém no comparativo com a literatura, os animais se mostraram quase que em sua totalidade com níveis glicêmicos abaixo do esperado levando em consideração valores de referência da espécie. Talvez este fato possa ser explicado pelos níveis basais de cortisol se encontrarem bem próximos dos valores mínimos aceitos como referência, ou talvez tenha uma possível reação com o hipotireoidismo que será discutida a seguir.

A glicose durante as atividades de AB e AP demonstrou não ter relação com os níveis de cortisol, pois embora a glicemia pareça mais baixa no grupo AP no T1 (comparando com o mesmo grupo no T0 e ao grupo AB no T1), isto não foi comprovado estatisticamente. Assim, todos os valores de glicemia obtidos em ambos os grupos não foram diferentes estatisticamente ao longo do período de observação. Já os níveis de cortisol se apresentaram significativamente diferentes nos dois paradigmas.

Estes dados divergem dos encontrados por Armario et al. (1996), onde a glicose foi considerada um parâmetro relevante na avaliação do estresse juntamente com o cortisol, e dos apresentados por Radosevich, et al. (1989), em que cães avaliados durante diferentes

atividades mostraram dados tanto de cortisol quando de glicose se elevando de acordo com a intensidade e duração da atividade. Devido ao diagnóstico de hipotireoidismo em nossos animais, é possível que isto possa ter influenciado nos resultados da glicemia pós-atividade e, portanto pode explicar a controvérsia em relação à literatura.

Dados complementares de avaliação hipotireoidismo canino foram buscados através utilização de outros parâmetros fisiológicos, como o colesterol e o lactato. As anormalidades estruturais ou funcionais da glândula tireoide podem levar a produção deficiente de hormônios tireoidianos. Um esquema de classificação conveniente para o hipotireoidismo foi criado e baseia-se na localização do problema dentro do complexo glandular hipotálamo-hipófise-tireoide. O hipotireoidismo primário é a forma mais comum deste distúrbio em caninos, que resulta de problemas dentro da glândula tireoide, geralmente a destruição da glândula. Os dois achados histológicos mais comuns neste distúrbio são a tireoide linfocítica e a atrofia idiopática da glândula tireoide. A tireoide linfocítica é um distúrbio imunologicamente mediado, caracterizado por uma infiltração difusa de linfócitos, macrófagos e plasmócitos na glândula tireoide. Os fatores que desencadeiam a tireoide linfocítica são pouco compreendidos, mas fatores genéticos indubitavelmente desempenham um papel. Já atrofia idiopática da glândula tireoide é caracterizada por perda do parênquima tireoidiano. Não há infiltrado inflamatório. A causa da atrofia tireoidiana idiopática é desconhecida, mas ela pode ser um distúrbio degenerativo primário, bem como pode representar o estágio final de uma tireoide linfocítica.

O hipotireoidismo secundário resulta da falha de desenvolvimento dos tireotrofos hipofisários ou da disfunção dentro deles, causando secreção deficiente de TSH e uma deficiência secundária na síntese e secreção do hormônio da tireoide. O hipotireoidismo secundário também poderia ocorrer devido à destruição dos tireotrofos hipofisários como na neoplasia hipofisária ou por supressão da função tireoidiana por drogas ou hormônios como o cortisol. O hipotireoidismo terciário por deficiência de TRH ainda não foi relatado em caninos (NELSON & COUTO, 2006).

A incidência é maior em cães entre 4 e 10 anos de idade e de médio a grande porte. Os sinais clínicos mais comuns em cães hipotiróideos são alopecia bilateral com ou sem hiperpigmentação; letargia física; embotamento mental; intolerância ao frio; frequência cardíaca baixa; infertilidade constipação e ganho de peso. Achados laboratórios importantes juntamente com níveis baixos de  $T_3$  e  $T_4$  são anemia e a hipercolesterolemia que pode estar

presente em até 75% dos cães. Porém a ocorrência primária da deficiência dos hormônios tireoidianos pode ser lenta e insidiosa, e os sinais clínicos e achados laboratoriais podem ser inespecíficos (CHANSTAIN & PANCIERA, 1997).

O diagnóstico do hipotireoidismo canino é baseado em sinais clínicos e principalmente achados laboratórios, para isso utiliza-se dosagens hormonais e para sua interpretação se utiliza os dados de valores de normalidade da espécie já amplamente descritos e definidos na literatura, com mínimas variações entre eles: Para o T<sub>3</sub>: 0,5 - 1,8 ng/dL (JOHNSON, 2011), T<sub>4</sub>: 1,5 - 3,6 mcg/dL (ESPINEIRA et al., 2007), TSH: 0 - 39 mcUI/L (KANEKO et al., 1997) e para o Colesterol: 139 -171 mg/dL (MEYAR et al., 1995). Importante ressaltar que essas referências foram utilizadas como base comparativa dos níveis séricos hormonais neste estudo.

O colesterol está presente na dieta de todos os indivíduos, pode ser absorvido lentamente pela pelo trato gastrointestinal e é altamente lipossolúvel. Além do colesterol absorvido todos os dias pelo trato gastrointestinal, que é chamado colesterol exógeno, uma quantidade ainda maior é formada nas células do corpo, o chamado colesterol endógeno.

Os dados do colesterol repetem a uniformidade dos demais resultados já descritos, tanto entre indivíduos quanto entre sexos, e novamente só quando comparados com os valores esperados é que observamos alterações, já que todos os animais apresentam níveis de colesterol elevados em relação aos valores esperados para espécie. Tais resultados reforçam o diagnóstico de hipotireoidismo nesses animais.

Em 2010, o grupo de Yas-Natan avaliou cães diagnosticados com hipotireoidismos e constatou, assim como nós em nossos cães, a presença da hipercolesterolemia nesses animais, porém contrariamente aos nossos dados glicêmicos, os níveis plasmáticos de glicose de seus cães se mostraram normais. Mas os dados encontrados por Okojima et al. (1979), se assemelham aos nossos, pois durante o hipotireoidismo induzido em roedores, os mesmos apresentaram um diminuição na gliconeogênese, com consequente diminuição nos níveis de glicose.

Do ponto de vista metabólico, o músculo esquelético é capaz de realizar extremas proezas por alguns poucos segundos, mas são muito menos capazes de fazê-los durante a atividade prolongada. A maior parte da energia extra não pode vir dos processos oxidativos, pois eles são lentos demais em sua resposta. Em vez disso, a energia extra provém de fontes anaeróbias, como a liberada pela quebra glicolítica do glicogênio em ácido láctico. A liberação

de energia pela glicólise pode ocorrer muito mais rapidamente do que liberação oxidativa. Conseqüentemente a maior parte da energia extra durante a atividade vigorosa, que perdure por mais 5 a 10 segundos é originada da glicólise anaeróbia. Como consequência o conteúdo de glicogênio nos músculos durante o período de atividade vigorosa é reduzido, enquanto a concentração de ácido láctico no sangue aumenta (GUYTON & HALL, 2006).

Dessa forma a utilização de medidores de lactato sanguíneo antes e depois do exercício, se torna um importante instrumento para avaliação da intensidade da atividade física para aquele indivíduo e também para diferenciação entre as atividades. A utilização dos níveis lactato sanguíneo para diferenciação da intensidade dos desafios apresentados para animais, se mostrou eficaz, pois observou-se de forma clara, através do comportamento do lactato durante a atividade, que os dois paradigmas se diferem significativamente na relação da intensidade do desafio. Os paradigma AP se revelou de alto impacto no que se refere à utilização de energia muscular, enquanto no paradigma AB os níveis de lactato se mantiveram inalterados, demonstrando este paradigma não ser expressivo no consumo de energia muscular. Assim, associado às dosagens de cortisol, os níveis de lactato aumentando de forma diferenciada foram importantes para se estabelecer dois níveis de intensidade de atividades em nosso estudo: baixo impacto, no caso do adestramento básico que não apresentou aumento significativo nos níveis de lactato e alto impacto, no caso do ataque e proteção que apresentou níveis elevados de lactato. Desta forma pudemos então estudar o EHHT em duas condições de trabalho distintas e investigar se a intensidade da tarefa pode influenciar na economia dos hormônios tireoidianos.

Além disso, o nível sérico de lactato pode se mostrar um bom parâmetro indicativo para algumas desordens sistêmicas, entre elas o hipotireoidismo. Um estudo realizado com pacientes portadores de hipotireoidismo clínico e subclínico observou que os níveis de lactato basal nesses pacientes eram significativamente mais elevados em relação aos pacientes não portadores, mostrando também uma relação direta inversamente proporcional entre os níveis sanguíneos de lactato e  $T_4$  livre (MCGROWDER, et al., 2011) e lactato e  $T_3$  e  $T_4$  (ROTI, et al., 1980). Estes estudos vem a corroborar diretamente os dados que foram observados por nós, pois os cães em sua totalidade se apresentaram em hiperlactemia em relação ao valores basais esperados para espécie. Nos valores de lactato basal também não foi observado dimorfismo sexual, acompanhando assim os outros parâmetros avaliados.

Por fim, acreditamos que o presente estudo tenha contribuído sobremaneira não apenas na área da Fisiologia Integrativa, no sentido de estabelecimento de relações multidirecionais entre eixos neuroendócrinos distintos e o estresse, mas também na área da Medicina Veterinária aplicada, no sentido de que alterações no manejo de animais de trabalho são necessárias visando o bem-estar animal e o aumento de desempenho dos mesmos. Estudos futuros utilizando diferentes manejos e de avaliação de desempenho poderão aumentar o impacto das nossas descobertas.

## 8. CONCLUSÕES

- Os animais deste estudo apresentaram em condições basais respostas secretórias do eixo HHA normais levando em consideração os valores de referência para espécie. Porém em relação ao eixo HHT, os animais apresentaram respostas secretórias características de hipotireoidismo primário em relação aos valores considerados como referência para espécie.
- Em relação aos dois paradigmas aplicados AP e AB os mesmos se mostraram diferenciados em sua intensidade como foi demonstrado pelos níveis de lactato durante a atividade, onde o paradigma de AP demonstrou ser uma atividade de maior intensidade. Em relação ao eixo HHA também se observou diferenciação dos dois paradigmas nos níveis de cortisol mostrando-se o paradigma de AP mais efetivo na elevação dos níveis do mesmo durante a atividade dos animais. Já no eixo HHT essa diferenciação só foi observada nos níveis de T3 onde observou-se queda durante o paradigma de AP.
- Não foi observado dimorfismo sexual nem em condições basais, tão pouco durante as atividades, nos dois eixos avaliados HHA e HHT.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMARIO, A.; MARTI, O.; MOLINA, T.; PABLO, J.; VALDES, M. Acute stress markers in humans: response of plasma glucose, cortisol and prolactin to two examinations differing in the anxiety they provoke. **Psychoneuroendocrinology** . v. 21. n. 1, p. 17-24. 1996.
- BEERDA, B.; SHILDER, M.B.H.; HOOFF, J.A.R.A.M.; VRIES, H.W. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 52, p. 307-319. 1997.
- BEERDA, B.; SHILDER, M.B.H.; HOOFF, J.A.R.A.M.; VRIES, H.W.; MOL J.A. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 58, p. 365-381. 1998.
- BEERDA, B.; SHILDER, M.B.H.; HOOFF, J.A.R.A.M.; VRIES, H.W.; MOL J.A. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. **Physiology & Behavior**. n.2, v. 66, p. 233-242. 1999.
- BEERDA, B.; SHILDER, M.B.H.; HOOFF, J.A.R.A.M.; VRIES, H.W.; MOL J.A. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses . **Physiology & Behavior**. n.2, v. 66, p. 243-254. 1999.
- BIANCO, A.C & SILVA, J.E. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. **Endocrinology**. v.120, p. 55-62. 1987.
- CARRASCO, G. A.; KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**. v. 463, p. 235-272. 2003.
- CHASTAIN, C.B.; PANCIERA, D.L. Afecções Hipotiróideias. In: **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. Editora Manole, 1997. p. 2054-2072
- DENTICE, M.; MARSILI, A.; AMBROSIO, R.; GUARDIOLA, O.; SIBILIO, A.; PAIK, J.H.; MINCHIOTTI, G.; DEPINHO, R.A.; FENZI, G.; LARSEN, P.R.; SALVATORE, D. The FoxO3/type 2 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration. **J Clin Invest**. v.120, p. 4021-4030. 2010.

ELIAS, L. L. K.; CASTRO, M. Controle Neuroendócrino do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. In: **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rodrigues, J.A.; Moreira, A.C.; Elias, L.L.K.; Castro, M. Editora Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 2005. p. 171-191.

ESPINEIRA, M.M.D.; MOL, J.A.; PEETERS, M.E.; POLLAK, Y.W.E.A.; IVERSEN, L.; DIJK, J.E.V.; RIJNBERK, A.; KOOISTRA, H.S. Assessment of Thyroid Function in Dogs with Low Plasma Thyroxine Concentration. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 21 p. 25-32. 2007

FORTUNATO, R.S; IGNACIO, D.L; PADRON, A.S; PECANHA, R.; MARASSI, M.P; ROSENTHAL, D.; WERNECK-DE-CASTRO, J.P; CARVALHO, D.P. The effect of acute exercise session on thyroid hormone economy in rats. **J Endocrinol**. v.198, p. 347-353. 2008.

FRANCI, C.R. Estresse: Processos Adaptativos e Não-Adaptativos. In: **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rodrigues, J.A.; Moreira, A.C.; Elias, L.L.K.; Castro, M. Editora Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 2005. p. 210-223.

GOTTSCHALKA, J.; EINSPANIER, A.; UNGEMACHB, F.R.; ABRAHAM, G. Influence of topical dexamethasone applications on insulin, glucose, thyroid hormone and cortisol levels in dogs. **Research in Veterinary Science**. v. 90, p. 491-497. 2011.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Metabolismo dos Carboidratos e Formação do Trifosfato de Adenosina. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier Rio de Janeiro, 2006. p. 829-839.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Metabolismo dos Lipídios. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier Rio de Janeiro, 2006. p. 840-851.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. energética Celular e Taxa Metabólica. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier Rio de Janeiro, 2006. p. 881-888.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Hormônios Metabólicos da Tireóide Metabolismo dos Carboidratos e Formação do Trifosfato de Adenosina. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier Rio de Janeiro, 2006. p. 931-943.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Hormônios Adrenocorticais. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier Rio de Janeiro, 2006. p. 944-960.

- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Insulina, Glucacon e Diabetes Melito. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier Rio de Janeiro, 2006. p. 961-977.
- HAVERBEKE, A.; DIEDERICH, C.; DEPIEREUX, E.; GIFFROY, J.M. Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. **Physiology & Behavior**. v. 93, p. 59-67. 2008.
- HANNESSY, M.B.; DAVIS, H.N.; WILLIAMS, M.T.; CAROLYN MELLOTT, C.; DOUGLAS, C.W. Plasma Cortisol Levels of Dogs at a County Animal Shelter. **Physiology & Behavior**. v. 62, p. 485-490. 1997.
- HETTS, S.; CLARK, J.D.; CALPIN, J.P.; ARNOLD, C.E.; MATEO, J.M. Influence of housing conditions on beagle behavior. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 34, p. 137-155. 1992.
- HIBY, E.F.; RONEY, N.S.; BRADSHAW, J.W.S. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. **Physiology & Behavior**. v. 89, p. 385-391. 2006
- HORVÁTH, Z.; IGYÁRTÓ, B.Z; MAGYAR, A.; MIKLÓSI, A. Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge. **Physiology & Behavior**. v. 52, p. 621-630. 2007.
- HORVÁTH, Z.; DÓKA, A.; MIKLÓSI, A. Affiliative and disciplinary behavior of human handlers during play with their dog affects cortisol concentrations in opposite directions. **Hormones & Behavior**. v. 54, p. 107-114. 2008.
- HUANG, W.S; YU, M.D; LEE, M.S; CHENG, C.Y; YANG, S.P; CHIN, H.M; WU, S.Y . Effect of treadmill exercise on circulating thyroid hormone measurements. **Med Princ Pract**. v. 13,p. 15-19. 2004
- HUBRECHT, R.C.; SERPEEL, J.A.; POOLE, T.B. Correlates of pen size and housing conditions on the behavior of kennelled dogs. **Applied Animal Behaviour**. v. 34, p. 365-383. 1992.
- INGBAR, S.H.; FRENINKEL, N. The influence of ACTH, Cortisone and Hidrocortisone on the distribution and peripheral metebolismo of thyroxine. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 34, p. 1375-1379. 1955.

JOHNSON, L.R. Laboratory Tests. In: **Clinical Veterinary Advisor Dogs and Cats**. Côté, Etienne. Editora Elsevier Morby USA, 2011.

KANEKO, J.J., Thyroid Function. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals – Fifth Edition**. Academic Press, 1997, p. 571-588.

LEFEBVRE, D.; DELCOURT, M.; GIFFROY, J.M. The quality of the relation between handler and military dogs influences efficiency and welfare of dogs. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 104, p. 49-60. 2007.

LEFEBVRE, D.; GIFFROY, J.M.; DIEDERICH, C. Cortisol and behavioral responses to enrichment in military working dogs. **Japan Ethological Society and Springer**. v. 27, p. 255-265. 2009.

LOUZADA-NETO, R.A. Papel dos glicocorticóides na regulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireoide e das desidratação após o exercício de alta intensidade. **Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 103 f. 2011.

MAZAKI-TOVI, M.; FEUERMAN, Y.; SEGER, G.; KLEMENT, E.; YAS-NATAN, E.; FARKAS, A.; KOL, A.; SHAMAY, A. Increased serum leptin and insulin concentrations in canine hypothyroidism. **The Veterinary Journal**. v. 183, n. 1, p. 109-114. 2010.

MCEWEN, B.S.; Protective and damaging effects of stress mediators. **The England Journal of Medicine Boston**. v. 338, p.171-175. 1998.

MCGROWDER, D.A.; FRASER, Y.P.; CRAWFORD, T.V.; RAWLINS, J.M. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase activities in patients with thyroid disorders. **Nigerian Journal of Clinical Practice**. v. 14, n.4, p.454-459. 2011.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. Apêndice: Valores Normais e Tabelas de Conversão. In: **Medicina de Laboratório Veterinária – Interpretação e Diagnóstico**. Editora Roca, São Paulo 1995.

MÁRQUEZ, S.R.; JAIME, H.B.; PALOCIOS, G.V.; GARCIA, R.M.; MOCTEZUMA, J.V. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. **Hormones and Behavior**. v. 44, p. 327-337. 2003.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Distúrbios da Glândula Tireóide In: **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Editora Elsevier Rio de Janeiro, 2006. p. 665-698.

NORRIS, D.O. The Mammalian Hypothalamus-Pituitary Axes. In: **Vertebrate Endocrinology**. NORRIS, D.O. Elsevier Academic Press USA, 2007. p. 106-164

NUNES, M.T. Regulação Neuroendócrina da Função Tireoidiana. In: **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rodrigues, J.A.; Moreira, A.C.; Elias, L.L.K.; Castro, M. Editora Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 2005. p. 249-261.

OLIVARES, E.L.; ALMEIDA, C.S.; PESTANA, F.M.; CÔRTEZ, R.S.; ARAUJO, I.G.; RODRIGUES, N.C.; MECAWI, A.S.; CÔRTEZ, W.S.; MARASSI, M.P.; REIS, L.C.; F. ROCHA, F.F. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. **Neuropharmacology** v.62 ,p.446-456 .2012.

RADOSEVICH, P.M.; NASH, J.A.; LACY, D.B.; CORMAC O'DONOVAN, C.; WILLIAMS, P.E.; ABUMRAD, N.N. Effects of low- and high-intensity exercise on plasma and cerebrospinal fluid levels of ir-fl-endorphin, ACTH, cortisol, norepinephrine and glucose in the conscious dog. **Brain Research**. v. 498, p. 89-98. 1989.

RONE, J.K; DONS, R.F; REED, H.L. The effect of endurance training on serum triiodothyronine kinetics in man: physical conditioning marked by enhanced thyroid hormone metabolism. **Clin Endocrinol (Oxf)**. v. 37, p. 325-330. 1992

ROONEY, N.J.; SAMANTHA A. GAINES, S.A.; BRADSHAW, J.W.S. Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. **Physiology & Behavior**. v. 92, p. 847-854. 2007.

ROSE, P. C.; CARRILO, C.T.; ASENSIO, C.; KLEIN, M.; VISSER, T.J.; BURGER, A.G.; MÉIER, C.A.; JEANRENUD, F.R. Hypothyroidism in rats decreases peripheral glucose utilisation, a defect partially corrected by central leptin infusion. **Diabetologia**. v. 48, p.624-633. 2005

ROTI, E.; BANDINE, P.; ROBUSCHI, G.; EMANUELE, R.; BOLAGNESI, R.; CIARLINE, E.; BUZZONETTI, P.; GNUDI, A. Serum concentrations of myoglobin, creatine kinase, lactate dehydrogenase and cardiac isoenzymes in euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid subjects. **Recerca in clinica e in laboratório**. v. 10, n.4, p. 609-617. 1980.

SEYLE, H. The Evolution of the Stress Concept. **American Scientist**. V.61, p. 692-699, 1973.

SIMONIDES WS & VAN HARDEVELD C. Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. **Thyroid**. v. 18, p. 205-216. 2008

SPANGENBERG, L.M.F.; BJORKLUND, L.; DAHLBORN, K. Outdoor housing of laboratory dogs: Effects on activity, behavior and physiology. **Applied Animal Behaviour Science**. v .98, p. 260-276. 2006.

VADEN S.L., J.S. KNOLL, F. W.K. SMITH, L. P. TILLEY JR. . Laboratory tests and diagnostic procedures Canine & Feline. In : **Blackwell's five minute veterinary consult**, Ed.Wiley – Blackwell 2009.

WALKER, J.K.; DALE, A.R.; D'EATH, R.B. WEMELSFELDER, F. Welfare assessment in dogs: Reducing the invasiveness of welfare assessment methodology through trial and validation of qualitative, behavioral-based approach. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**. v. 4, p. 102-104. 2009.

WILBER, J.F.; UTIGER, R.D. The Efect of Glucocorticoids on Thyrotropin Secreton. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 48, p. 2096-2103. 1969.