

MAURO JOSÉ LAHM CARDOSO

**MARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO E
HOMEOSTASE DO CÁLCIO NO HIPERTIREOIDISMO
FELINO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista –
UNESP, Campus de Botucatu para a obtenção do título
de Doutor em Medicina Veterinária

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucy Marie Ribeiro Muniz

BOTUCATU – SP

Maio - 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**MARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO E
HOMEOSTASE DO CÁLCIO NO HIPERTIREOIDISMO
FELINO**

MAURO JOSÉ LAHM CARDOSO

BOTUCATU – SP

Maio - 2006

Composição da Banca Examinadora da Tese de autoria de Mauro José Lahm Cardoso apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, na data de 12 de maio de 2006, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Profa. Dra. Lucy Marie Ribeiro Muniz

Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

Profa. Dra. Márcia Marques Jericó

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Prof^a. Dra. Maria Jaqueline Mamprim

"Por muito tempo eu pensei que a minha vida fosse se tornar uma vida de verdade, mas sempre havia um obstáculo no caminho... Algo a ser ultrapassado antes de começar a viver: um trabalho não terminado, uma conta a ser paga.

Aí sim, a vida começaria de verdade.

Por fim, cheguei à conclusão de que esses obstáculos eram a minha vida de verdade."

Essa perspectiva tem-me ajudado a ver que não existe um caminho para a felicidade.

A felicidade é o caminho!"

Alfred D. Souza

**“ Uma pedra preciosa não pode ser polida sem fricção,
nem um homem se aperfeiçoar sem enfrentar desafios ”**

Confucius

AGRADECIMENTOS

Qualquer ação, por menor que seja, é um imenso acontecimento, pois se reflete de algum modo no mundo inteiro. Por isso o processo de realização de toda e qualquer atividade humana nunca é estanque e isolado. Pela participação direta ou indireta de muitos é que as coisas são criadas e recriadas, descobertas e redescobertas.

O presente trabalho não fugiu à regra. Ele não pode ser visto sob uma perspectiva singular, pois é a soma da contribuição de infinitos rostos que desfilam diante de mim neste momento onde a fadiga tem o sabor doce do dever cumprido. Muitos destes rostos não têm nomes claros em minha mente, mas isso não interfere na grande importância que tiveram. Quero correr o risco de ser traído pela memória ao citar alguns nomes, e se acaso alguém cair no esquecimento, peço que me perdoe e ainda assim, obrigado.

Os meus sinceros agradecimentos:

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado e pela acolhida que todos me proporcionaram.

Ao povo do Estado de São Paulo, que pela contribuição feita através dos impostos, tornou possível que a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo concedesse o auxílio à pesquisa.

À Fundação Faculdades Luiz Meneghel, instituição a qual sou professor por ter concedido a minha liberação e também aos meus colegas de trabalho por terem compreendido este momento. Em especial aos professores Rodrigo dos Reis Oliveira, Mariana do Amaral Correa, Ademir Zacarias Júnior e Liza Ogawa.

A professora Eunice Oba pelo auxílio e orientação na realização das dosagens hormonais.

A todos os professores das disciplinas do curso de Doutorado em especial à Dra. Aguemí Kahayagama pelos grandes ensinamentos transmitidos nas suas disciplinas e com idéias para o desenvolvimento para a pesquisa; e a Dra. Maria Jaqueline Mamprim pela amizade e paciência nas horas de desânimo.

À professora Vânia Maria Vasconcelos Machado pela colaboração e revisão dos textos da língua inglesa.

À bibliotecária Selma Maria pela grande ajuda na confecção e na elaboração das referências bibliográficas.

Ao povo da Radiologia meu muito obrigado pela ajuda e convivência. Aos funcionários da Radiologia, Benedito José Alho Favon, Wilma Maria de Castro, Marco Antonio Fumes Pelicci pela ajuda na realização do experimento e amizade constante. Aos colegas de pós-graduação da Radiologia em especial a Viviani Montick de Castro.

Aos professores Flávio Quaresma Moutinho e Sônia Regina Verde da Silva Franco pela amizade, carinho e grandes ensinamentos na vida profissional.

À professora Cida Valério, pela ajuda incansável na análise estatística.

Ao professor Dr. Rudi Weiblen da UFSM - Santa Maria - RS, por ter me ensinado a gostar do trabalho científico e por ser um exemplo de caráter e profissionalismo.

Aos meus amigos Liliane Dantas, Luiz Henrique de Araújo Machado, Fabíola Zahn, Otávio Filho, Rafael Torres Neto, Eidi Yoshihara e Rodrigo dos Reis Olibeira que mesmo indiretamente contribuíram muito para que esta vitória fosse alcançada. Podem ter certeza que vocês sempre ocuparão um lugar especial no meu coração.

À minha orientadora Dra. Lucy Marie Ribeiro Muniz, por suas palavras de sabedoria, de incentivo e de compreensão. Muito obrigado pelos ótimos momentos de convivência e ao final desta etapa poder dizer que Dra Lucy o mais importante de tudo foi sua amizade.

Ao meu amigo e colega Fabiano Séllos Costa pela paciência, pelas conversas, pelos risos, pela angústia e desespero compartilhado nos momentos que tudo dava errado.

Aos meus cães e gatos por terem me proporcionado momentos de alegria quando a tristeza e as dificuldades relutavam em não ir embora.

À minha família que sempre me incentivou e me deu força para eu atingir meus objetivos. No final desta etapa a minha vitória é a vitória de vocês. Horas mal dormidas e o suor do seu trabalho também fazem parte deste "nosso" trabalho. Muito obrigado pai, muito obrigado mãe, que apesar de tão longe, sempre estiveram comigo.

A Deus que proporcionou momentos tão felizes durante este período do curso de Doutorado. Obrigado Mestre.

E finalmente aos animais que contribuíram com este trabalho.

LISTA DE TABELAS

Trabalho 1 – Tabela 1: Concentração sérica da osteocalcina (OC) e do telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP), e os valores em milímetros de alumínio (mmAl) da densidade mineral óssea em gatos saudáveis (n=14). _____ 40

Trabalho 1 – Tabela 2: Correlação entre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e densidade mineral óssea em gatos saudáveis (n=14). ____ 40

Trabalho 2 - Tabela 1: Valores séricos dos hormônios tireoidianos e do paratormônio (PTH), valores dos minerais sanguíneos e densidade mineral óssea em 14 gatos normais (M0) e após a indução a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3). Valores são expressos como média \pm desvio padrão (intervalo). _____ 58

Trabalho 2 – Tabela 2: Correlação entre parâmetros bioquímicos, hormonais e densidade mineral óssea em 14 gatos normais (M0) e após a indução a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3). _____ 59

Trabalho 2 – Tabela 3: Precisão intra-ensaio e inter-ensaio das mensurações realizadas por RIMA e RIE em 14 gatos normais (M0) e após a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3). _____ 60

Trabalho 3 – Tabela 1: Valores séricos dos hormônios tireoidianos e dos marcadores do metabolismo ósseo e densidade mineral óssea em 14 gatos normais (M0) e após a indução a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3). Valores são expressos como média \pm desvio padrão (intervalo). _____ 81

Trabalho 3 – Tabela 2: Correlação entre os hormônios tireoidianos, marcadores do metabolismo ósseo e a densidade mineral óssea em 14 gatos normais (M0) e após a indução a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3). _____ 82

Trabalho 3 - Tabela 3: Precisão intra-ensaio e inter-ensaio das mensurações realizadas por RIMA e RIE 14 gatos normais (M0) e após a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3). _____ 83

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	3
Introdução	5
Revisão de Literatura	8
Homeostase do cálcio	10
Marcadores do metabolismo ósseo	14
Densidade mineral óssea	21
Trabalho 1: Marcadores Séricos do Metabolismo Ósseo em Gatos	22
Resumo	24
Abstract	24
Introdução	26
Material e Métodos	28
Resultados	30
Discussão	31
Conclusões	34
Referências bibliográficas	35
Trabalho 2: Homeostase do Cálcio no Hipertireoidismo Felino	41
Resumo	43
Abstract	43
Introdução	45
Material e Métodos	47
Resultados	49
Discussão	50
Conclusões	54
Referências bibliográficas	54
Trabalho 3: Marcadores do Metabolismo Ósseo no Hipertireoidismo Felino	61
Resumo	63

Abstract	64
Introdução	65
Material e Métodos	68
Resultados	70
Discussão	72
Conclusões	75
Referências bibliográficas	75
Discussão Geral	84
Conclusões Gerais	92
Referências bibliográficas	93
Anexos	104

CARDOSO, M.J.L. Marcadores do metabolismo ósseo e homeostase do cálcio no hipertireoidismo felino. Botucatu, 2006. 125p. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Os efeitos do hipertireoidismo experimental (150 µg/kg/dia/42 dias) na homeostase do cálcio e nos marcadores do metabolismo ósseo foram estudados em 14 gatos sem raça definida, com idade entre um e três anos. Houve uma clara tendência de aumento das concentrações séricas de PTH intacto a partir do momento inicial com diferença significativa entre este e os demais momentos. O cálcio ionizado demonstrou uma diminuição significativa aos 14 dias em relação ao momento inicial e aos 42 dias em relação aos 14 dias. Os hormônios tireoidianos apresentaram correlação positiva com o PTH e negativa com o cálcio ionizado. Já a densidade mineral óssea (DMO) apresentou tendência de correlação negativa com o PTH a partir dos 28 dias. Observou-se correlação negativa do PTH com o cálcio ionizado aos 14, 28 e 42 dias. Conclui-se que o hipertireoidismo em gatos adultos jovens sem doenças concomitantes apresenta hiperparatireoidismo secundário. As concentrações séricas da OC apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si, nos quatro momentos. O ICTP, um marcador específico da reabsorção óssea, não apresentou diferença significativa entre os momentos. Provavelmente o remodelamento ósseo foi provocado pelo estado hipertireóideo, visto que tanto a OC como o ICTP apresentou forte correlação positiva com a TT4 e um pouco inferior com a FT4. A FT4 não apresentou correlação positiva com o ICTP, excetuando-se aos 28 dias. Observou-se baixa correlação, em todos os momentos, entre os marcadores do metabolismo ósseo e a densidade mineral óssea. Conclui-se que o excesso dos hormônios tireoidianos em gatos provocou aumento do remodelamento ósseo visto que ocorreu alta correlação

entre estes hormônios e os marcadores do metabolismo ósseo. O hipertireoidismo provocou diminuição da DMO óssea, porém a OC e o ICTP apresentaram baixa correlação com esta variável.

Palavras-chave: hipertireoidismo, marcadores metabolismo ósseo, gatos, homeostase cálcio

CARDOSO, M.J.L. Markers of bone metabolism in cats and calcium homeostasis feline hyperthyroidism. Botucatu, 2006. 125p. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The effect of experimental hyperthyroidism (150 µg/kg/day/42 days) on calcium homeostasis and markers of bone metabolism was studied in fourteen shorthair cats from one to three years of age. Serum concentrations of unbroken PTH had a clear tendency to increase from beginning with significant differences from the initial to other moments. The ionized calcium significantly decreased at the 14 days in comparison to the initial moment and at the 42 days in comparison to the 14 days. The thyroid hormones showed positive correlation with PTH and negative with ionized calcium. In contrast, bone mineral density had a tendency of negative correlation with the PTH from the 28 days. Negative correlation of the PTH and calcium ionized was observed at 14, 28 and 42 days. In the present study, hyperthyroidism in young adult cats without concomitant illnesses did not present secondary hyperparathyroidism. However, increase of PTH and reduction of ionized calcium were observed. Serum concentrations of osteocalcin (OC) were significantly different among all four moments. The carboxi-terminal telopeptides of collagen type I (ICTP), a specific marker of the bone reabsorption, did not significantly differ ($p < 0.05$) between moments. Bone turnover was probably caused by the hyperthyroid state, since OC and ICTP presented strong positive correlation with TT4 and a little less with free T4 (FT4). The FT4 did not present positive correlation with the ICTP, excepting at the 28 days. Positive correlation in all the moments between markers of bone metabolism and bone mineral density was very low. In conclusion, the high correlation between thyroid hormones and markers of bone metabolism indicates that the excess of thyroid hormones in cats may cause an increase of

the bone turnover. Moreover, hyperthyroidism may cause reduction of the bone DMO, although OC and the ICTP had low correlation with DMO.

Keywords: hyperthyroidism, markers of bone metabolism, cats, homeostasis calcium

Introdução

INTRODUÇÃO

O hipertireoidismo ou tireotoxicose atualmente é considerada a endocrinopatia mais freqüente dos felinos nos Estados Unidos e no Reino Unido (MOONEY, 2001). O hipertireoidismo felino é uma alteração clínica multissistêmica resultante de excessivas concentrações dos hormônios tireoidianos (tiroxina e triiodotironina). Tanto a produção endógena dos hormônios da tireóide, como a instituição da terapia convencional com levotiroxina, pode proporcionar o aparecimento de sinais clínicos de tireotoxicose (FALLON et al., 1983; ADLIN et al., 1991; DIAMOND et al., 1991; CARDOSO, 2002).

O hipertireoidismo felino provoca alterações em diversos sistemas orgânicos, entre eles o sistema músculo-esquelético. Os hormônios tireoidianos podem influenciar o metabolismo ósseo diretamente ou via paratormônio (PTH) (MOSEKILDE et al., 1990; SERAKIDES et al., 2000). Barber & Elliot (1996) verificaram que 77% dos gatos apresentavam hiperparatireoidismo secundário ao hipertireoidismo felino espontâneo. Em um estudo experimental se observou a diminuição da densidade mineral óssea secundária ao hipertireoidismo (COSTA, 2002); contudo não existem trabalhos correlacionando os achados do hiperparatireoidismo (PTH, fósforo, cálcio total e cálcio ionizado) à densitometria mineral óssea em gatos com hipertireoidismo.

As radiografias ósseas, a densitometria mineral óssea e a histomorfometria revelam o balanço ósseo de algum momento, sendo que a última é um procedimento invasivo, pois necessita de biopsia óssea (CHAVASSIEUX et al., 2001), entretanto, existem vários testes bioquímicos para a mensuração sérica ou urinária de marcadores do metabolismo ósseo em humanos e animais (DELMAS, 1993). A base de todos os testes é a correlação da concentração sérica ou urinária destes marcadores com a atividade metabólica das células que formam o osso (osteoblastos) e as células que reabsorvem o osso (osteoclastos) (ALLEN, 2003).

Várias doenças metabólicas ósseas como hiperparatireoidismo, afetam a atividade de formação e reabsorção óssea (BARBER & ELLIOT, 1996) e conseqüentemente provocam mudanças nas concentrações séricas dos marcadores do metabolismo ósseo.

Os marcadores do metabolismo podem ser mensurados pelo teste radioimunométrico (RIMA), radioimunoensaio (RIE), ELISA, quimioluminescência, eletroforese e cromatografia líquida de alta performance. Os marcadores séricos de formação óssea são a fosfatase alcalina óssea (FAO), osteocalcina (OC), peptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I (PICP), peptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP). Os marcadores séricos da reabsorção óssea são a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e o telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP) (DELMAS, 2001).

Existem vários trabalhos em humanos (DELMAS et al., 1993) e animais (WEILER et al., 1995; PHILIPPOV et al., 1995; LIESEGANG et al., 2000) correlacionando os marcadores do metabolismo ósseo com diversas doenças que provocam alterações ósseas e, também, correlacionando com a densitometria mineral óssea (REMES et al., 2004).

Há trabalhos que mensuraram os marcadores do metabolismo ósseo em gatos normais (DELAURIER et al., 2004) ou com hipertireoidismo (HORNEY et al., 1995; ARCHER & TAYLOR, 1996; FOSTER & THODAY, 2000).

Os objetivos deste estudo foram:

1. Avaliar a relação entre os marcadores bioquímicos da formação e da reabsorção óssea e a densitometria mineral óssea, em gatos adultos jovens;
2. Avaliar a relação entre o cálcio total e iônico, fósforo e o paratormônio (PTH) e a densitometria mineral óssea, em gatos com hipertireoidismo experimental;
3. Avaliar a relação entre os marcadores bioquímicos da formação e da reabsorção óssea e a densitometria mineral óssea, em gatos com hipertireoidismo experimental.

Revisão de Literatura

REVISÃO DE LITERATURA

A tireóide é uma glândula endócrina primordial para a regulação metabólica. Os hormônios tireoidianos metabolicamente ativos são as iodotironinas: triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). A tiroxina é o principal hormônio secretório da tireóide. A T3 juntamente com a triiodotironina reversa (rT3) e outros metabólitos deiodinados também são secretados pela tireóide em cães e gatos (PETERSON & FERGUSON, 1992; KAPTEIN et al., 1994).

O hipertireoidismo (tireotoxicose) é uma alteração clínica multissistêmica resultante de excessivas concentrações dos hormônios tireoidianos (tiroxina e triiodotironina) (PETERSON et al., 2001). Atualmente o hipertireoidismo é tido como a doença endócrina mais comum em gatos domésticos nos Estados Unidos e Reino Unido (MOONEY et al., 1996ab; MOONEY, 2001). Tanto a produção endógena dos hormônios da tireóide, como a instituição da terapia convencional com levotiroxina pode proporcionar o aparecimento de sintomas clínicos de tireotoxicose (FALLON et al., 1983; ADLIN et al., 1991; DIAMOND et al., 1991; CARDOSO, 2002).

As concentrações séricas da T3 total (TT3), T3 livre (FT3), T4 total (TT4) e T4 livre (FT4) elevadas são os principais indicativos de hipertireoidismo felino, na maioria dos casos (MOONEY et al., 1996a). Broussard et al. (1995) relataram que aproximadamente 25% dos gatos com hipertireoidismo tinham a concentração de T3 normais e de T4 elevada, isso mostra a importância que a T4 tem para o diagnóstico (PETERSON, 1997). A concentração de TT4 dentro do padrão de normalidade para gatos normais pode ocorrer no hipertireoidismo, este achado foi descrito em 3% por Peterson et al. (1983), em 9% por Thoday & Mooney (1992), em 29 % por Broussard et al. (1995) e em 33,5% dos casos por Peterson et al. (2001).

Em um estudo com gatos hipertireóides, a concentração da FT4 estava elevada em 98,5% dos gatos e a TT4 em 91,3%. O inconveniente da mensuração é que 6-12% dos gatos eutiróides possuem a FT4 elevada, portanto o uso da FT4 deve ser feito com cautela, quando utilizada isoladamente (MOONEY et al., 1996b). A mensuração de FT4 foi avaliada em gatos hipertireóides e representa um bom teste diagnóstico, particularmente em gatos com TT4 dentro dos valores de referência. A concentração de FT4

permanece elevada nos pacientes que apresentam hipertireoidismo e doença não tireoidiana concomitante (PETERSON et al., 2001).

Homeostase do Cálcio

As glândulas paratireóides são responsáveis pela secreção de paratormônio (PTH), sob estímulo da concentração do cálcio sérico (BARBER, 2004). O PTH felino é um polipeptídeo contendo 84 aminoácidos. A seqüência de aminoácidos do PTH felino é idêntica à dos caninos e há aproximadamente 84% de semelhança com o PTH humano. A maior parte desta semelhança está na região aminoterminal (aminoácidos 1-34), a porção ativa do hormônio (TORIBIO et al., 2002).

O PTH juntamente com a calcitonina e o calcitriol (vitamina D ativa) são os responsáveis pela regulação da concentração do cálcio nos líquidos extracelulares. A principal função do PTH é manter a concentração plasmática do cálcio dentro de uma pequena margem de variação, via ação no osso e nos rins. Secundária a esta função o PTH regula a concentração do fósforo no plasma (BARBER, 2004). As funções do PTH são estimular a liberação de cálcio e fósforo do osso, aumentar a reabsorção de cálcio e inibir a reabsorção de fósforo no filtrado glomerular, estimular a síntese de calcitriol nos túbulos proximais renais e indiretamente aumentar a reabsorção intestinal de cálcio e fósforo intestinal (ROSOL & CAPEN, 1996).

O principal estimulante da secreção do PTH é a diminuição da concentração do cálcio ionizado extracelular. A concentração sérica do fósforo e do calcitriol regulam indiretamente a secreção das paratireóides, pois influenciam na concentração de cálcio, além disso, também possuem efeitos diretos (BARBER, 2004).

Estudos em humanos demonstraram secreção pulsátil do PTH (KITAMURA et al., 1990; CALVO et al., 1991) correspondendo ao ritmo do cálcio, do fósforo e da renovação óssea. O meio da manhã é o horário indicado para a colheita de sangue em humanos, por corresponder ao momento da secreção do PTH (KITAMURA et al., 1990). Enquanto não houver estudos em

felinos deve-se adotar o mesmo horário da colheita de sangue dos humanos (BARBER, 2004).

As amostras de sangue para as dosagens do PTH devem ser obtidas, processadas e congeladas a -80°C em menos de duas horas (BARBER, 2004), pois o PTH é relativamente termolábil e qualquer erro no manuseio pode provocar resultados erroneamente diminuídos (BARBER et al., 1993).

No organismo, o cálcio sérico total, normalmente mensurado por método colorimétrico, é a somatória do cálcio ligado às proteínas plasmáticas (40%), principalmente à albumina, cálcio quelado (10%), ou seja, formando compostos com o citrato, fosfato ou sulfato e cálcio ionizado (50%) ou a parcela livre do cálcio (BARBER, 2004). O cálcio ionizado é a porção biologicamente ativa do cálcio, a sua diminuição sangüínea é o principal estimulante da secreção de PTH (CHATTOPADNYAY, 2000).

O cálcio pode estar ligado às proteínas plasmáticas, a condição de hipoalbuminemia pode diminuir a concentração total do cálcio, mas não altera a concentração de cálcio ionizado (FELDMAN, 2004).

A mensuração da fração ionizada do cálcio plasmático é relativamente restrita devido à dificuldade de acesso e disponibilidade de equipamentos, e à necessidade de colheita do material em condições de anaerobiose e da mensuração ter que ser realizada logo após, quando comparada com a maioria dos exames laboratoriais. Todas essas precauções têm a finalidade de evitar a alteração do pH sangüíneo e, por conseguinte, da fração de cálcio ionizado. Com o recente desenvolvimento de instrumentos semi-automatizados, utilizando-se eletrodos íons seletivos, a mensuração sérica do cálcio ionizado pode ser facilmente realizada (POLLARD, et al., 2001). Recomenda-se que os valores séricos de referência para o cálcio total e cálcio ionizado devam ser determinados pelos próprios laboratórios. Em média os valores variam de 1,02 a 1,32 mmol/L (FELDMAN, 2004).

O hipertireoidismo é uma causa bem conhecida de alteração do metabolismo ósseo, caracterizado por aumento na atividade osteoblástica e osteoclástica com predomínio da reabsorção óssea e resultando em diminuição na massa óssea (MOSEKILDE et al., 1990; GARNERO et al., 1994). A taxa de renovação óssea é refletida no sangue e na urina com alteração dos níveis de

enzimas, minerais e outras substâncias envolvidas na deposição e reabsorção ósseas. (FRASER et al, 1971).

A tiroxina tende a diminuir a absorção do cálcio intestinal, entretanto os valores podem estar aumentados devido ao estímulo à osteólise. O excesso dos hormônios tireoidianos exerce um efeito direto sobre o metabolismo ósseo, parecendo estimular diretamente a reabsorção óssea. O aumento da retirada de cálcio do tecido ósseo induz, de forma compensatória, a um decréscimo da secreção do PTH, na tentativa de manter os níveis séricos de cálcio normais (MOSEKILDE & CHRISTENSEN, 1977; PETERSON et al., 1983). Segundo Mosekilde et al. (1990), a diminuição dos níveis séricos do PTH circulante está correlacionada ao aumento na taxa de reabsorção tubular de fosfato. Este parece ser o fator de maior importância para justificar um aumento sérico dos níveis de fósforo; entretanto, um aumento da mobilização de fósforo de origem óssea e dos tecidos moles também pode contribuir para este acontecimento.

Peterson et al. (1983) não evidenciaram a ocorrência de hipercalcemia em nenhum dos 131 gatos com o diagnóstico confirmado de hipertireoidismo. Em todos os animais os valores sempre se mantiveram dentro dos limites normais para a espécie, obtendo-se valores médios de $9,1 \pm 0,1$ mg/dl. Neste mesmo estudo 20% dos 131 gatos hipertireóides apresentaram elevação sérica do fósforo, enquanto a maioria desses animais não apresentava azotemia associada. Este fato é importante, segundo os autores, pois a insuficiência renal é capaz de induzir a hiperfosfatemia devido a um decréscimo da filtração glomerular do fósforo circulante.

Avaliando amostras de sangue de 30 gatos com hipertireoidismo, Barber & Elliot (1996) verificaram que 77% dos animais apresentavam-se com hiperparatireoidismo associado, sendo este fato considerado de ocorrência comum nesta espécie. Em 43% dos gatos havia elevação dos níveis de fósforo sérico ($1,83 \pm 0,08$ nmol/L) e em 27% dos gatos com tireotoxicose havia baixos valores de cálcio ionizado ($1,22 \pm 0,02$ nmol/L) quando comparado com o grupo-controle. Estas alterações nas concentrações de cálcio e fósforo foram acompanhadas por aumento significativo do paratormônio intacto em gatos hipertireóides ($85 \pm 17,2$ pg/mL) quando comparados com normais ($11,8 \pm 1,2$ pg/mL). Este fato, segundo os autores, não permite explicar o aumento do

fósforo plasmático como decorrente de uma elevada taxa de reabsorção óssea mediada pelo paratormônio. A vitamina D ativa ou 1,25-dihidroxicolecalciferol ou calcitriol foi mensurada em oito gatos e três apresentaram aumento, a concentração média nos gatos hipertireóideos ($46,9 \pm 8,9$ pg/mL) não apresentou diferença significativa dos gatos normais. Neste mesmo estudo observou-se também aumento da fosfatase alcalina total (279 ± 29 UI/L). O PTH não apresentou correlação significativa com TT4 e FA. O PTH apresentou correlação significativa com a concentração do fósforo, onde 20% da variabilidade na concentração do PTH foi devido às alterações do fósforo plasmático.

A indução à tireotoxicose em ratas da raça wistar, não alterou a concentração de cálcio plasmático total e não foi observada correlação positiva com os valores de T4 livre, entretanto observou-se correlação positiva dos valores de fósforo plasmático e níveis séricos de FT4 (SERAKIDES et al., 2000). Gouveia et al. (1997) demonstraram que a administração exógena de doses elevadas de levotiroxina potencializa e agrava a osteopenia decorrente do processo de hipogonadismo em ratas castradas. Observou-se significativa diminuição da densidade mineral óssea na coluna, no fêmur e na cauda de ratos hipertireóideos (KUNG & NG, 1994).

Segundo Beigel et al. (1983), o hipertireoidismo é capaz de influenciar o metabolismo do cálcio aumentando a atividade osteoclástica e proporcionando aumento da reabsorção óssea e, também, promover um decréscimo da absorção do cálcio intestinal e hipercalcúria. Entretanto, a maioria dos pacientes tende a apresentar valores dentro dos padrões de normalidade.

Em humanos com hipertireoidismo os aumentos da FA óssea, da osteocalcina, do cálcio e do fósforo, são achados comuns associados ao aumento do metabolismo ósseo secundário aos efeitos ósseos do T4 (RHONE et al., 1980). Em contrapartida não há sinais clínicos atribuídos a alterações ósseas associadas com osteoporose nos relatos de hipertireoidismo felino (THODAY & MOONEY, 1992; BROUSSARD et al., 1995; PETERSON, 1997).

Marcadores do Metabolismo Ósseo

Os ossos são continuamente renovados durante toda a vida, como resultado dos processos de formação e reabsorção ósseas realizados por osteoblastos e osteoclastos, respectivamente (RAISZ, 1999). A formação e reabsorção normalmente estão em equilíbrio, contudo, podem ocorrer alterações provocadas pela idade, alterações hormonais, atividade física ou doenças músculo-esqueléticas. Em gatos, as doenças músculo-esqueléticas como o hiperparatireoidismo secundário (BARBER & ELLIOT, 1998), hipervitaminose A e neoplasia são importantes causas de morbidade e mortalidade. (LEONARD & TILLSON, 2001).

Uma forma de avaliar a atividade osteoblástica ou osteoclástica dos ossos é através da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo. Os marcadores bioquímicos da remodelação óssea podem ser divididos em marcadores de formação e marcadores de reabsorção óssea (ALLEN, 2003). Esses marcadores podem ser dosados tanto no sangue como na urina (DELMAS, 1993). São métodos simples, sensíveis e acurados no reconhecimento da progressão de doenças metabólicas ósseas ou na resposta à terapia com drogas. Os marcadores do metabolismo ósseo quantificam em tempo real a atividade de formação ou reabsorção das células ósseas enquanto a densitometria mineral e as radiografias ósseas são estáticos (COLEMAN, 2002). Diferente de biopsias ósseas repetidas, as mensurações dos marcadores ósseos séricos ou urinários não interferem no metabolismo ósseo (ALLEN, 2003).

Os marcadores bioquímicos do remodelamento (*turnover*) ósseo são enzimas sintetizadas por osteoblastos e osteoclastos, ou compostos orgânicos liberados durante a síntese e reabsorção da matriz óssea (SEIBEL, 2000). Vários testes bioquímicos foram descritos para a mensuração da concentração sérica ou urinária dos marcadores do metabolismo ósseo em humanos (DELMAS, 2001). Eles podem ser mensurados usando métodos variados, incluindo a cromatografia líquida, RIE, ensaio radioimunométrico (RIMA), quimioluminescência e ELISA (DELAURIER et al., 2004).

Os marcadores da formação óssea são detectados somente no soro e os marcadores de reabsorção óssea podem ser detectados no soro ou na urina

(ALLEN, 2003). Os marcadores da formação óssea são a osteocalcina (OC), fosfatase alcalina total (FAT), fosfatase alcalina óssea (FAO), peptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I (PICP) e peptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP) enquanto os marcadores de reabsorção óssea são a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), o telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP), piridinolina (U-PYD), deoxipiridinolina (U-DPD), hidroxiprolina (U-HYP), porção aminoterminal do procolágeno I (U-NTX) e porção carboxiterminal do procolágeno I (U-CTX) (DELMAS, 2001)

A média dos valores e a variabilidade inter-individual para os marcadores de formação e reabsorção são várias vezes maiores em jovens do que em adultos. Os pontos negativos da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo são os custos, a baixa especificidade e sensibilidade, sendo influenciados pela dieta, pelo ciclo circadiano e pela função renal (MORA et al., 1999).

Existem trabalhos em humanos (DELMAS et al., 1993) em bovinos (HOLTENIUS & EKELUND, 2005; LIESEGANG et al., 2000), cães (ALLEN et al., 2000; ALLEN et al., 1998; PHILIPPOV et al., 1995), eqüinos (PRICE et al., 1995; PRICE et al., 2001), ovinos (JOHNSON et al., 1997), ratos (CHAVASSIEUX et al., 2001) e suínos (WEILER et al., 1995) correlacionando os marcadores do metabolismo ósseo com diversas doenças que provocam alterações ósseas e, também, correlacionando com a densitometria mineral óssea (REMES et al., 2004).

Os marcadores do metabolismo ósseo são utilizados, em humanos, no diagnóstico definitivo ou no monitoramento de doenças ósseas metabólicas como osteoporose, hiperparatireoidismo, associados com biopsia óssea e/ou densitometria mineral óssea (CHAVASSIEUX et al., 2001). Também podem ser utilizados no monitoramento da terapia com fármacos e/ou alimentos que possam alterar o funcionamento das células ósseas (SEIBEL et al., 1989; DELMAS et al., 1993; CHRISTGAU et al., 1998).

Já em animais, os marcadores do metabolismo ósseo podem ser utilizados em estudos da biologia óssea (PRICE et al., 1995; ALLEN et al., 1998), na avaliação da consolidação de fraturas (FRANCIS & MILLIS, 2002), em neoplasia esquelética (GARZOTTO et al., 2000), na osteoartrite (FOX & COOK, 2001), na avaliação dos efeitos pré-clínicos das dietas e drogas

(ALLEN, 2003). Além disso, os marcadores do metabolismo ósseo podem ser utilizados em estudos de doenças que provocam alterações ósseas.

A sensibilidade e especificidade dos marcadores da formação e da reabsorção óssea em animais necessitam de comprovação. Para esta comprovação são necessários trabalhos que correlacionem os valores dos marcadores do metabolismo com os achados de histomorfometria e com a densitometria mineral óssea (ALLEN et al., 2003). O hipertireoidismo felino, conforme descrito por COSTA (2002), pode provocar diminuição da densidade mineral óssea, entretanto este trabalho não correlacionou com os marcadores do metabolismo ósseo.

Foi realizada recentemente a mensuração sérica de marcadores da formação óssea em cães de diversas raças (BREUR et al., 2004) e a mensuração na urina e no soro de marcadores da formação e reabsorção óssea em gatos (DELAURIER et al., 2004).

A fosfatase alcalina óssea (FAO) é um marcador específico da formação óssea, trata-se de uma enzima produzida somente pelos osteoblastos sendo essencial para mineralização óssea (BREUR et al., 2004). A FAO possui importante papel na precipitação de cálcio e fósforo entre as fibras colágenas durante a formação óssea. Níveis elevados da FAO ocorrem freqüentemente em pacientes portadores de doenças ósseas, devido ao aumento da atividade osteoblástica, como osteíte deformante, osteomalácia, hiperparatireoidismo, consolidação de fraturas e neoplasias ósseas primárias ou secundárias (ALLEN, 2003).

A osteocalcina (OC), proteína ácida carboxiglutâmico óssea, é uma pequena proteína do colágeno de 46 a 52 aminoácidos arranjados em uma simples cadeia peptídica na matriz extracelular mineralizada do tecido ósseo, dentina e cementum (GUNDBERG et al., 1984; HAUSCHKA & WIANS, 1989). Esta proteína é sintetizada somente por osteoblastos e megacariócitos e é dependente de vitamina K (THIEDE et al., 1994).

A função da OC no tecido ósseo ainda não está totalmente elucidada, embora sua estreita associação com a fase mineral, indica algum papel no processo de mineralização (ALLEN, 2003). A osteocalcina é secretada pelos osteoblastos maduros no estágio final de diferenciação dos osteoblastos, durante o período da mineralização da matriz extracelular. A fração de OC

recém sintetizada é liberada na circulação, podendo ser medida por radioimunoensaio. A OC tem mostrado seguir um padrão circadiano e refletir a formação óssea. A quantidade de osteocalcina que entra na circulação sangüínea depende da taxa de secreção individual dos osteoblastos e do número de osteoblastos que secretam a proteína (NIELSEN, 1994).

Cerca de 90% da matriz óssea é colágeno tipo I. O colágeno tipo I é composto por moléculas de ligação do colágeno tipo I, moléculas interligadoras das regiões aminoterminal e carboxiterminal do colágeno tipo I e uma estrutura piridinolínica (ALLEN, 2003).

Os pró-peptídeos do colágeno tipo I são outros marcadores da formação óssea (ALLEN, 2003). A síntese de colágeno tipo I pelos osteoblastos representa o estágio inicial da formação do osso. O colágeno tipo I é sintetizado como uma grande molécula de pró-colágeno, secretada dentro dos espaços extracelulares e depois quebrada por proteases que liberam peptídeos (fragmentos) do pró-colágeno. (EBELING et al., 1992). Os fragmentos do pró-colágeno produzidos durante o processo de maturação do colágeno são liberados para a circulação e também podem ser dosados por testes específicos, representando a formação óssea na saúde ou na doença (DELMAS, 1993).

Os fragmentos do pró-colágeno são os peptídeos carboxiterminal do procolágeno tipo I (PICP) e aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP). Esses marcadores ósseos podem ser usados como índices da formação óssea em doenças ósseas metabólicas com a osteoporose (EBELING et al., 1992). Esses fragmentos produzidos pelos osteoblastos são os marcadores de formação óssea clinicamente mais sensíveis e específicos (SWAMINATHAN, 2001). Comercialmente estão disponíveis kits de RIE e ELISA para mensuração sérica do PICP e do PINP em humanos, havendo reação cruzada com o soro de animais (ALLEN, 2003).

O PICP é uma das porções terminais da molécula de pró-colágeno, liberado na circulação sangüínea durante a síntese do colágeno tipo I. Em várias situações, demonstrou-se a relação entre os níveis sanguíneos de PICP e a taxa de formação óssea (MELKKO et al., 1990; PARFITT et al., 1987) e vários estudos descrevem a utilidade desse peptídeo como marcador bioquímico da formação óssea durante o crescimento normal e em diversas

doenças que apresentam alteração do metabolismo ósseo (TRIVEDI et al., 1991; ERIKSEN et al., 1993).

Convém lembrar que esses marcadores procedem de diferentes fases do processo de formação óssea e, portanto, as alterações nos seus níveis podem depender de mecanismos diferentes, dependendo da fisiopatologia de cada doença. Para a determinação do PICP, está disponível um kit comercial de RIE que utiliza anticorpos policlonais (MELKKO et al., 1990).

O PINP também é liberado na circulação sanguínea durante o processo de síntese de matriz óssea. Uma pequena porção desse fragmento terminal pode ser incorporada durante a formação da matriz óssea e liberada, posteriormente, durante a sua degradação. No entanto, estudos comparativos revelam que os níveis de PINP apresentam uma boa correlação com os níveis de PICP. O PINP também pode ser mensurado por RIE (LINKHART et al., 1993).

Os kits utilizados em humanos para a mensuração sérica do PINP como do PICP não demonstraram reação cruzada com o soro canino (ALLEN et al., 2005). Até o momento não há descrição da utilização destes kits em gatos.

No tecido ósseo, as moléculas de colágeno estão unidas por três resíduos do aminoácido hidroxilisina, lisina ou seus derivados, de maneira que cada duas moléculas de colágeno estão unidas entre si por uma estrutura cíclica fluorescente chamada piridinolina. Os telopeptídeos (extremidades da cadeia protéica) carboxiterminal e aminoterminal do colágeno tipo I, cujas cadeias protéicas estão unidas entre si pela estrutura piridinolínica, são liberados durante a degradação do colágeno tipo I (RISTELI et al., 1993), dando origem ao telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX ou ICTP) e ao telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (NTX).

O CTX e o NTX podem ser mensurados tanto no soro como na urina, enquanto que o ICTP somente no soro (DELMAS et al., 2000) e possui a vantagem de não ser afetado pela depuração renal (RISTELI et al., 1993). Demonstrou-se, *in vivo* e *in vitro*, uma correlação significativa entre os níveis do ICTP e a taxa de degradação da matriz óssea por meio de histomorfometria (ERIKSEN et al., 1993). Atualmente, dispõe-se de um RIE policlonal (RISTELI et al., 1993) para a determinação do ICTP no soro e na urina, respectivamente.

Allen et al. (1998) observaram reação cruzada entre o kit humano e soro canino, portanto pode ser usado nesta espécie.

Piridinolina (PYD) e deoxipiridinolina (DPD) também são produtos do metabolismo do telopeptídeo amino e carboxiterminal do colágeno tipo I, liberados durante a reabsorção óssea, e encontrados na urina na forma livre e/ou ligado (ROBINS, 1995). A DPD é um dos mais sensíveis marcadores de reabsorção óssea, pois não está presente no colágeno tipo I da pele (ALEEN, 2003). A fosfatase ácida tartarato-resistente sérica (TRAP) é uma enzima liberada pelos osteoclastos, mas também é derivada de eritrócitos. Seu uso tem sido limitado por se tratar de uma enzima não estável no soro, mesmo quando congelada. No momento, os melhores marcadores da reabsorção óssea são a DPD e o ICTP (CHRISTGAU et al., 1998; SWAMINATHAN, 2001).

Vários fatores como a idade, sexo, exercício, ritmo circadiano de secreção, variação individual e doenças sistêmicas influenciam nas concentrações dos marcadores do metabolismo ósseo (WATS, 1999).

Existem na literatura dados da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo em gatos normais (DELAURIER et al., 2004) ou com hipertireoidismo (HORNEY et al., 1995; ARCHER & TAYLOR, 1996).

O hipertireoidismo é uma causa bem conhecida de alteração do metabolismo ósseo, caracterizado por aumento na atividade osteoblástica e osteoclástica com predomínio da reabsorção óssea e resultando em diminuição na massa óssea (MOSEKILDE et al., 1990).

O uso dos marcadores do metabolismo ósseo pode ser particularmente interessante nas investigações das alterações ósseas associadas com doença da tireóide. A mensuração da fosfatase alcalina óssea é um teste específico e sensível na avaliação do metabolismo ósseo no hipertireoidismo (GARNERO et al., 1993). A osteocalcina, um marcador específico e sensível da formação óssea, aumenta no hipertireoidismo em humanos, correlacionando-se positivamente com o grau da hiperatividade da tireóide e negativamente com as alterações na densidade mineral óssea (LEE et al., 1990). Os hormônios tireoidianos estimulam diretamente os osteoblastos a secretarem osteocalcina (RIZZOLI et al., 1990). Estudos hemodinâmicos e histomorfométricos por outro

lado demonstraram que a reabsorção óssea está aumentada no hipertireoidismo (MOSEKILDE et al., 1977).

O aumento da FAO foi descrita em gatos hipertireóides por diversos autores sendo também um achado freqüente no hipertireoidismo felino (ARCHER & TAYLOR, 1996; BARBER & ELLIOTT, 1996; HORNEY et al., 1995). Nenhum dos trabalhos apresentou correlação positiva com o aumento da TT4, diferentemente do que ocorre em humanos. Esses resultados sugerem que a tireotoxicose em gatos pode desencadear alterações nos ossos dos animais com hipertireoidismo. Em ratas com hipertireoidismo experimental não foi observada correlação positiva entre FT4 e a fosfatase alcalina, além de ter ocorrido decréscimo nos níveis da FA (SERAKIDES et al., 2000), contrariando os resultados encontrados em humanos com hipertireoidismo (AUWERX & BOUVILLON, 1986).

Em humanos com hipertireoidismo os aumentos da FA óssea, da osteocalcina, do cálcio e do fósforo são achados comuns associados ao aumento do metabolismo ósseo secundário aos efeitos ósseos do T4 (RHONE et al., 1980). Em contrapartida, não há sinais clínicos atribuídos a alterações ósseas associadas com osteoporose nos relatos de hipertireoidismo felino (THODAY & MOONEY, 1992; BROUSSARD et al., 1995; PETERSON, 1997).

Archer & Taylor (1996) estudando 36 gatos hipertireóides mensuraram a osteocalcina por radioimunoensaio, 44% dos gatos tinham aumento ($0,32 \pm 0,3$ ng/mL) da osteocalcina quando comparado com o grupo controle (0 a 0,25 ng/mL), mas não havia diferença significativa entre os grupos. No mesmo trabalho observou-se correlação linear inversa entre FA e a osteocalcina, sem diferença significativa. Em geral, há correlação entre os níveis séricos de osteocalcina e os níveis de formação óssea observados pela histomorfometria e também, com outros marcadores do metabolismo ósseo (JOFFE et al., 1994)

Densitometria Mineral Óssea

A determinação da densidade mineral óssea é um fator fundamental para a definição do quadro de desmineralização, servindo também para o estabelecimento de um protocolo terapêutico e o monitoramento dos pacientes acometidos, podendo desta forma prevenir a ocorrência de fraturas patológicas (SCHARLA et al., 1999). Diferentes técnicas densitométricas são descritas na medicina veterinária e humana, visando proporcionar precisão nos dados e boas condições de trabalho. Inúmeros relatos demonstram que a técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas é útil para avaliação da densidade mineral óssea, pois se apresenta com alta precisão, tendo o seu uso uma importância destacada (RAHAL et al., 2002; VULCANO et al., 1998; LOUZADA et al., 1997; LOUZADA, 1991).

A densitometria mineral óssea, em relação à radiografia simples, além de detectar a osteopenia possui a vantagem de melhorar a identificação e quantificação das alterações regionais ou sistêmicas da densidade mineral óssea (ALLEN et al., 2000), porém poucos centros veterinários utilizam este meio diagnóstico na prática clínica. Um dos inconvenientes da densitometria óssea é a incapacidade de distinguir se a alteração na densidade mineral óssea (DMO) foi provocada por efeitos da formação ou da reabsorção óssea. Já os marcadores do metabolismo ósseo mensurados na urina ou soro são específicos para a formação ou reabsorção óssea (ALLEN et al., 2003).

A diminuição da densidade mineral óssea em humanos hipertireóides foi descrita em diversos estudos (ALLAIN & MCGREGOR, 1992). Em ratas com hipertireoidismo se observou osteopenia (GOUVEIA et al. (1997) e diminuição significativa da densidade mineral óssea (KUNG & NG, 1994). Em gatos há somente um trabalho descrevendo a diminuição da densidade mineral óssea secundário ao hipertireoidismo (COSTA, 2002), entretanto este trabalho não correlacionou com os marcadores do metabolismo ósseo.

Trabalho 1

A ser encaminhado para o periódico Journal of Feline Medicine and Surgery

ISSN: 1098-612x

Endereço:

Taeselbury, High Street,

Tisbury, Wiltshire,

SP3 6LD,

Reino Unido

Normas para publicação disponível em:

http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm.

Marcadores séricos do metabolismo ósseo em gatos

Markers of bone metabolism in cats

Mauro José Lahm CARDOSO¹, Fabiano Séllos COSTA²,
Lucy Marie Ribeiro MUNIZ³, Maria Aparecida VALÉRIO⁴

Fonte Financiadora: FAPESP

1-Departamento de Patologia Geral - Fundação Faculdades Luiz Meneghel (FFALM) – UNESPAR – Bandeirantes – PR/ Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Campus Botucatu.

Adress: Hospital Veterinário - FFALM BR 369 Km 54

Caixa Postal 261

86360-000 Bandeirantes – PR

maurolahm@ffalm.br

2-Departamento de Medicina Veterinária, CCA – UFES – Alegre – ES/ Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Campus Botucatu.

3-Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Campus Botucatu.

4-DEDAG - Fundação Faculdades Luiz Meneghel (FFALM) – UNESPAR – Bandeirantes – PR/

Resumo

Os processos de formação e reabsorção óssea acontecem continuamente no organismo e uma das maneiras de avaliar as alterações nestes processos é através da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo no soro ou na urina. A osteocalcina é um produto específico, produzido pelos osteoblastos durante a fase de mineralização óssea e é usada como marcador bioquímico da formação óssea. O telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP) é liberado durante a degradação do colágeno tipo I, portanto é um marcador bioquímico da reabsorção óssea. O objetivo deste estudo foi de mensurar em gatos adultos jovens a OC, peptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP) e ICTP e a densitometria mineral óssea e avaliar a correlação entre eles, bem como indicar os valores de referência para gatos com idade entre 1 e 3 anos. Neste estudo foram utilizados 14 gatos sem raça definida, nove fêmeas e cinco machos, não castrados, com idade entre 1 e 3 anos. A concentração sérica da OC mensurada por ensaio radioimunométrico e do ICTP mensurado por radioimunoensaio foram, respectivamente, $0,15 \pm 0,03$ ng/mL e $8,59 \pm 5,78$ ng/mL. A média (\pm DP) da DMO apresentada foi $1,40 \pm 0,23$ mmAl. Os marcadores do metabolismo ósseo apresentaram baixa correlação entre si e com a DMO. Este estudo conclui que kits para mensuração da osteocalcina e do ICTP de humanos podem ser usados em gatos com o objetivo de avaliar as alterações no remodelamento ósseo, enquanto o kit para avaliação do PINP de humanos não deve ser utilizado nestes animais.

Palavras-chave: marcadores, metabolismo, ósseo, gatos

Abstract

Bone formation and reabsorption are continuous processes in the organism and measuring serum or urinary markers of the bone metabolism is one way to evaluate possible alterations of these processes. Osteocalcin (OC) is a specific hormone produced by osteoblasts during the bone mineralization phase and may be used as biochemical marker of bone formation. The carboxi-terminal telopeptide of collagen type I (ICTP) is released during the collagen type I degradation, and therefore may be used as biochemical marker of bone

reabsorption. The objective of this study was to measure the OC, amino-terminal propeptides of procollágeno type I (PINP) and ICTP and the bone mineral density in young adult cats and to evaluate the correlation between them, as well as to establish the reference intervals for cats between 1 and 3 years of age. Fourteen intact shorthair cats, nine females and five males, between 1 and 3 years of age, were used in this study. Serum concentrations of OC and ICTP were measured by immunoradiometric and radioimmunoassay and found to be 0.15 ± 0.03 ng/mL and 8.59 ± 5.78 ng/mL, respectively. DMO concentrations were 1.40 ± 0.23 mmAl. Markers of bone metabolism showed low positive correlation with DMO. In conclusion, kits designed for OC and ICTP measurements in human beings may be used in cats to evaluate bone remodeling alterations. However, the kit for human PINP did not work on our study and therefore should not be used for feline bone evaluation.

Keywords: markers, metabolism, bone, cats

Marcadores séricos do metabolismo ósseo em gatos

Introdução

Nos últimos anos vários avanços foram alcançados no diagnóstico de doenças esqueléticas. Estes avanços foram obtidos com o uso da tomografia computadorizada, cintilografia nuclear, ressonância magnética e radiografia de dupla energia, entretanto estas técnicas estão disponíveis somente em alguns centros veterinários de referência (Allen et al 1998).

Uma alternativa a estes métodos é a mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo, pois eles quantificam em tempo real a atividade de formação ou reabsorção das células ósseas, enquanto a densitometria mineral e as radiografias ósseas não o fazem em tempo real (Coleman 2002). Diferente de biopsias ósseas repetidas, mensurações dos marcadores ósseos séricos ou urinários não interferem no metabolismo ósseo (Allen 2003). Os marcadores bioquímicos da remodelação óssea podem ser divididos em marcadores de formação e marcadores de reabsorção óssea. Esses marcadores podem ser dosados tanto no sangue como na urina (Delmas 1993).

Os marcadores bioquímicos do remodelamento (*turnover*) ósseo são enzimas sintetizadas por osteoblastos e osteoclastos, ou compostos orgânicos liberados durante a síntese e reabsorção da matriz óssea (Seibel 2000). O objetivo da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo é a correlação das concentrações séricas ou urinárias com a atividade dos osteoblastos (formação) e dos osteoclastos (reabsorção) (Allen 2003).

Os marcadores da formação óssea são detectados somente no soro e os marcadores de reabsorção óssea podem ser detectados no soro ou na urina (Allen 2003). Os marcadores da formação óssea são osteocalcina (OC), fosfatase alcalina total (FAT), fosfatase alcalina óssea (FAO), peptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I (PICP) e peptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP) enquanto os marcadores de reabsorção óssea são fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP), piridinolina (U-PYD), deoxipiridinolina (U-DPD), hidroxiprolina (U-HYP), porção aminoterminal do procolágeno I (U-NTX) e porção carboxiterminal do procolágeno I (U-CTX) (Delmas 2001).

A sensibilidade e especificidade dos marcadores da formação e da reabsorção óssea em animais necessitam de comprovação. Para esta comprovação são necessários trabalhos que correlacionem os valores dos marcadores do metabolismo com os achados da histomorfometria e com a densitometria mineral óssea. O hipertireoidismo felino, conforme descrito por COSTA (2002), pode provocar diminuição da densidade mineral óssea, entretanto este trabalho não correlacionou com os marcadores do metabolismo ósseo.

Foi realizada recentemente a mensuração na urina e no soro de marcadores da formação e reabsorção óssea em gatos (Delaurier et al 2004).

A osteocalcina (OC), proteína ácida carboxiglutâmico óssea, é uma pequena proteína do colágeno de 46 a 52 aminoácidos arranjados em uma simples cadeia peptídica na matriz extracelular mineralizada do tecido ósseo, dentina e *cementum* (Gundberg et al 1984, Hauschka and Wians 1989). Esta proteína é sintetizada somente por osteoblastos e megacariócitos e é dependente de vitamina K (Thiede et al 1994). Mesmo a osteocalcina sendo uma abundante proteína óssea não colágena, o seu papel na formação óssea é pouco conhecido (Price et al 1981), porém se sabe que os níveis séricos OC refletem acuradamente a atividade sintética dos osteoblastos e em geral se observa correlação entre seus níveis séricos e a formação óssea mensurados pela histomorfometria (Eastell et al 1988).

Os pró-peptídeos do colágeno tipo I são outros marcadores da formação óssea (Allen 2003). A síntese de colágeno tipo I pelos osteoblastos representa o estágio inicial da formação do osso. O colágeno tipo I é sintetizado como uma grande molécula de pró-colágeno, secretada dentro dos espaços extracelulares e depois quebrada por proteases que liberam peptídeos (fragmentos) do pró-colágeno. (Ebeling et al 1992). Os fragmentos do pró-colágeno produzidos durante o processo de maturação do colágeno são liberados para a circulação e também podem ser dosados por testes específicos, representando a formação óssea na saúde ou na doença (Delmas 1993). Os fragmentos do pró-colágeno são os peptídeos carboxiterminal do procolágeno tipo I (PICP) e aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP).

O telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP) é liberado durante a degradação do colágeno tipo I (Ristelli et al 1993). O ICTP é

mensurado somente no soro (Delmas et al 2000) e possui a vantagem de não ser afetado pela depuração renal (Ristelli et al 1993). Demonstrou-se, *in vivo* e *in vitro*, uma correlação significativa entre os níveis do ICTP e a taxa de degradação da matriz óssea por meio de histomorfometria (Eriksen et al 1993).

A determinação da densidade mineral óssea é um fator fundamental para a definição do quadro de desmineralização, servindo também para o estabelecimento de um protocolo terapêutico e o monitoramento dos pacientes acometidos, podendo desta forma prevenir a ocorrência de fraturas patológicas (Scharla et al 1999). Inúmeros relatos demonstram que a técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas é útil para avaliação da densidade mineral óssea em animais, pois se apresenta com alta precisão, tendo o seu uso uma importância destacada (Louzada et al 1997, Vulcano et al 1998, Rahal et al 2002).

A densitometria mineral óssea, em relação à radiografia simples, além de detectar a osteopenia possui a vantagem de melhorar a identificação e a quantificação das alterações regionais ou sistêmicas da densidade mineral óssea (Allen et al 2000), porém poucos centros veterinários utilizam este meio diagnóstico na prática clínica. Um dos inconvenientes da densitometria óssea é a incapacidade de distinguir se a alteração na densidade mineral óssea (DMO) foi provocada por efeitos da formação ou da reabsorção óssea. Já os marcadores do metabolismo ósseo mensurados na urina ou soro são específicos para a formação ou reabsorção óssea (Allen et al 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre a osteocalcina, PINP e ICTP e a densitometria mineral óssea, em gatos adultos jovens e indicar os valores de referência para gatos com idade entre um e três anos.

Material e Métodos

Foram utilizados quatorze gatos sem raça definida, nove fêmeas e cinco machos, não castrados, com idade entre um e três anos. O estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP, Botucatu, SP.

Os animais foram mantidos em jaulas individuais de ferro esmaltado, alimentados com ração seca comercial e água à vontade. Os animais eram vacinados, vermifugados e livres de ectoparasitas.

As colheitas de sangue, para obtenção do soro foram realizadas entre 9 e 10 horas da manhã, para minimizar a variação (Liesegang et al 1999).

Colheita das amostras

As amostras de sangue foram obtidas da veia jugular dentro de tubos contendo gel ativador de coágulo. Os tubos foram centrifugados a 2000g por 10 minutos em menos de uma hora pós a colheita. Após a separação do soro as amostras foram aliquoteadas em cinco frascos de 1,2 mL e congeladas em freezer a -70°C até o momento da realização dos testes.

Mensuração do PINP, do ICTP e da osteocalcina

A mensuração das concentrações séricas de PINP (Procollagen PINP, Orion Diagnostica, Espoo, Finlândia) e do ICTP (ICTP, Orion Diagnostica, Espoo, Finlândia) foram realizadas utilizando-se kit humano comercial. A mensuração das concentrações séricas de osteocalcina foi realizada usando-se kit humano comercial para o teste RIMA (Osteocalcina, DSL, Texas, USA). Os protocolos recomendados pelos fabricantes para a realização das mensurações não foram alterados. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata e as concentrações foram calculadas pela média da mensuração das amostras em duplicata. As amostras em duplicata com coeficiente de variação maior que 15% foram excluídas da análise deste estudo. O teste detecta concentração de PINP de humanos entre 0-250 ng/ml, com sensibilidade mínima descrita é de 2 ng/ml. O teste detecta concentração de ICTP de humanos entre 0-50 µg/l, com sensibilidade mínima descrita é de 0,4 µg/l. O teste detecta concentração de osteocalcina de humanos entre 0-60 µg/ml, com sensibilidade mínima descrita é de 0,3 ng/ml.

Coeficiente de Variação

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da mensuração em duplicata das amostras foram usados para a determinação da precisão intra-ensaio dos marcadores do metabolismo ósseo séricos. Para a determinação da precisão foram feitos "pool" (n=16) de cada momento. Cada "pool" foi testado seis vezes dentro do mesmo teste. A média, o desvio padrão e o CV foram determinados para cada "pool" e a média do CV dos momentos

foi definido como a precisão inter-ensaio dos marcadores do metabolismo ósseo séricos.

Densitometria Mineral Óssea

A avaliação da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio direito foi realizada pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas, conforme descrito na literatura (Vulcano et al 1998, Rahal et al 2002), em quatro momentos. Para melhor análise seqüencial dos valores densitométricos, padronizou-se a seleção da região da metáfise localizada 5mm acima da cicatriz epifisária.

Análise Estatística

A análise estatística das variáveis ao longo dos diferentes momentos foi realizada considerando-se a técnica de análise de variância para medidas repetidas, teste de Fisher e teste de Tukey. Para a interpretação das letras, deve-se considerar que duas médias seguidas pelo menos de uma mesma letra não diferem ao nível de 5% de significância. Para o estudo da correlação entre as variáveis em cada um dos momentos, utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson.

Resultados

Os resultados das concentrações séricas da osteocalcina e do ICTP séricos, além da DMO estão descritos na Tabela 1.

Concentração sérica de PINP: não conservou a capacidade de detecção entre o kit humano para PINP e o soro felino. A realização do teste seguiu todas as orientações recomendadas pelo fabricante.

Concentração sérica de OC: o kit de OC conservou a capacidade de detecção nas amostras felinas e todos os valores estavam dentro da margem de detecção do kit, sem a necessidade de diluição das amostras. As concentrações séricas da OC variaram de 0,12 a 0,19 ng/mL.

Concentração sérica de ICTP: o kit de ICTP conservou a capacidade de detecção nas amostras felinas e todos os valores estavam dentro da margem de detecção do kit, sem a necessidade de diluição das amostras. As concentrações séricas do ICTP variaram de 1,51 a 9,92 ng/mL.

Não foi observada diferença estatística entre os quatro momentos do estudo.

Densidade mineral óssea: os valores da DMO variaram de 1,03 a 1,68 mmAl.

Correlação entre as variáveis estudadas: as correlações entre as diversas variáveis estudadas estão dispostas na Tabela 2. Os marcadores do metabolismo ósseo apresentaram baixa correlação com a DMO. Foi observada baixa correlação negativa entre a OC e o ICTP.

Coeficiente de Variação: o coeficiente de variação (CV) das amostras medidas em duplicatas foi usado para a determinação da precisão intra-ensaio. O CV para OC e ICTP foram, respectivamente, 8,13 e 4,96. O CV do "pool" de amostras da OC e do ICTP foram, respectivamente, 10,99 e 3,65 e foram definidas como a precisão inter-ensaio para cada ensaio.

Discussão

Embora haja descrições da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo em gatos (Archer and Taylor 1996, Delaurier et al 2004;), é a primeira vez e que se correlaciona marcadores do metabolismo ósseo com a densitometria mineral óssea nesta espécie. Além de apresentar os valores séricos da osteocalcina em gatos adultos jovens normais, foi buscado identificar se os kits comerciais para testes do ICTP e PINP em humanos podem ser usados em gatos.

Os resultados da OC sérica são semelhantes aos descritos por Archer and Taylor (1996), porém com uma variação menor. Estes mesmo autores verificaram que a OC variou de 0 a 0,25 ng/mL valores superiores aos obtidos neste estudo. Também é importante salientar que a idade dos animais variou de três a 18 anos, enquanto que no presente estudo a idade dos gatos variou de um a três anos. Em cães com idade entre um e dois anos e entre três e sete anos foi encontrada concentração sérica de osteocalcina de 13,62 ng/mL e 4,9 ng/mL, respectivamente (Allen et al 1998), estes valores são muito superiores aos descritos em gatos. Uma das razões para este fato provavelmente seja decorrente do fim do crescimento do esqueleto que em gatos ocorre em torno dos nove meses de idades, visto que esta é a idade que ocorre o fechamento completo das placas de crescimento (Delaurier et al 2004), mas segundo estes mesmos autores a maturidade do esqueleto de gatos acontece por volta dos dois anos, época em que ocorre redução dos marcadores da formação óssea.

Para comprovar esta hipótese é necessário um estudo dos marcadores ósseos em gatos com idade inferior a doze meses o que não foi realizado neste estudo. Outro fator que deve ser ressaltado é o fato da mensuração da OC em cães ter utilizado kit específico para cães, enquanto que nos gatos se utilizou kit para osteocalcina humana.

A conservação da capacidade de detecção dos kits é um ponto crítico da mensuração dos produtos da degradação do colágeno. Já foi descrita reação cruzada entre o soro de eqüinos e testes para PICP e ICTP de humanos (Price et al 1995) e entre soro canino e teste de ICTP humano (Philipov et al 1995, Allen et al 1998). Os resultados deste estudo confirmam que o kit de ICTP humano pode ser usado para a mensuração sérica do ICTP em gatos. Visto que foi descrito reação cruzada entre o soro e urina de gatos e os kits de humanos para a mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo na urina e no soro (Delaurier et al 2004).

Não se observou reação cruzada entre o kit para mensuração do PINP em humanos, o mesmo já havia sido descrito em cães (Allen et al 1998).

Até a realização deste estudo não haviam dados descrevendo os valores do ICTP sérico em gatos mensurados por radioimunoensaio. Já foi descrito a mensuração do ICTP sérico utilizando outros métodos como ELISA (Deularier 2004), portanto, a comparação entre os resultados aqui encontrados e os obtidos por estes autores não foi possível. Os gatos estudados apresentaram concentração sérica de ICTP semelhante aos cães com idades semelhantes (Allen et al 1998, Breuer et al 2004). Em cães com idade entre um e dois anos os valores médios descritos foram 8,7 ng/mL (3,8 a 13,6 ng/mL) e 7,2 ng/mL (1,0 a 13,3 ng/mL) em cães com idade entre três e sete anos (Allen et al 1998). Em cães da raça pomerânea com idade entre um e sete anos (média 3,9 anos) a concentração média do ICTP sérico foi 7,78 ng/mL (2,9 a 18,2 ng/mL) (Breuer et al 2004).

Diferentemente do descrito em cães por Allen et al. (1998), foi observada baixa correlação negativa entre a OC e o ICTP, porém era esperado que houvesse correlação entre os marcadores de formação e reabsorção óssea visto que isto já foi demonstrado em gatos (Delaurier et al 2004), em cães (Allen et al 2000) e em eqüinos (Price et al 1995). Segundo DeLaurier et al (2004) esta boa correlação indica que em gatos saudáveis com o esqueleto maduro

o processo de formação e reabsorções ósseas poderão estar intimamente associadas. Em cães com esqueleto imaturo a absorção e reabsorção óssea não estão associadas (Allen et al 2000) e isto pode ter contribuído com a baixa correlação neste estudo. Entretanto, é importante salientar que nenhum estudo em gatos correlacionou a OC com ICTP e, portanto o comportamento destes marcadores nos felinos pode ser diferente.

Também não foi observada boa correlação entre a DMO e os marcadores da formação e reabsorção óssea. Provavelmente isto decorre do equilíbrio que existe entre a formação e a reabsorção óssea em animais adultos por ação combinada dos osteoblastos e osteoclastos (Frost 1992); porém se houvesse um predomínio do processo de formação era esperado que houvesse correlação entre a OC e a DMO, pois, em geral se observa correlação entre os níveis séricos da OC e a formação óssea mensurados pela histomorfometria (Eastell et al 1988) e entre os níveis séricos do ICTP e reabsorção óssea, o que também pode ser comprovado pelo histomorfometria de biopsia óssea (Eriksen et al 1993).

A razão da baixa correlação entre a OC e o ICTP e entre eles e a densitometria mineral óssea não pode ser esclarecida neste estudo. Um fator que pode ter contribuído é o número de animais do estudo. Além disso, os marcadores do metabolismo ósseo possuem uma grande variabilidade biológica decorrentes da idade, sexo, raça, dieta, exercício e alterações circadianas (Watts 1999). Deve ser ressaltado que não são conhecidas as influências destas variáveis na concentração dos marcadores da formação e reabsorção óssea em felinos, sendo necessários mais estudos com esta finalidade.

Nesta pesquisa, foram adotadas medidas para minimizar estas alterações como a realização da colheita de sangue no mesmo horário, adaptação dos animais à mesma dieta e aos mesmos cuidados gerais. Em humanos suspeita-se que a correlação entre a osteocalcina e a densidade mineral óssea aumenta com a idade (Remes et al 2004). Fato semelhante também pode ocorrer em gatos, para a comprovação desta hipótese são necessárias mais pesquisas em gatos de todas as idades.

É importante salientar que a densitometria mineral óssea é uma técnica padrão-ouro de avaliação da atividade das células ósseas (Delaurier et al 2004)

e a OC e a ICTP apresentou baixa correlação. Estes resultados sugerem que a OC e o ICTP não devem ser utilizados isoladamente para avaliar o remodelamento ósseo em gatos por não terem apresentado boa correlação com DMO. São necessários mais estudos utilizando outros marcadores do metabolismo ósseo e correlacionando com a DMO e também com os achados histomorfométricos, antes da utilização clínica do ICTP e da OC.

Conclusões

Este estudo conclui que kits para mensuração da osteocalcina e do ICTP, por RIE, em humanos podem ser usados em gatos com o objetivo de avaliar as alterações no remodelamento ósseo, enquanto o kit para avaliação do PINP em humanos não deve ser utilizado em gatos saudáveis. Conclui-se também que a OC e o ICTP em gatos com idade entre 1 e 3 anos não apresentam correlação entre si, bem como com a DMO. A mensuração sérica dos marcadores da formação óssea (OC) ou da reabsorção óssea (ICTP) representa um meio simples e não invasivo de avaliação do metabolismo ósseo. São necessários mais estudos antes da aplicação clínica dos marcadores do metabolismo ósseo em gatos, em virtude da baixa correlação entre os marcadores e densidade mineral óssea.

Referências Bibliográficas

ALLEN LC, ALLEN MJ, BREUR GJ, HOFFAMANN WE, RICHARDSON DC (2000) A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. *Research Veterinary Science* **68**, 231-235.

ALLEN MJ (2003) Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Veterinary Clinical Pathology* **32**, 101-113.

ALLEN MJ, HOFFAMANN WE, BREUR GJ., RICHARDSON DC (1998) Serum markers of bone metabolism in dogs. *Research Veterinary Science* **59**, 250-254.

ARCHER JT, TAYLOR SM (1996) Alkaline phosphatase bone isoenzyme and osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. *Canadian Veterinary Journal* **37**, 735-739.

- BARBER P J, ELLIOT J (1996) Study of calcium homeostasis in feline hyperthyroidism. *Journal of Small Animal Practice* **37**, 575-82.
- BREUR GJ, ALLEN MJ, CARLSON SJ, RICHARDSON DC (2004) Markers of bone metabolism in dog breeds of different size. *Research Veterinary Science* **76**, 53-55.
- CHAVASSIEUX P, GARNERO P, DUBOEUF F, VERGNAUD P, BRUNNER-FERBER F, DELMAS PD, MEUNIER PJ (2001) Effects of a new selective estrogen receptor modulator (Mdl 103,323) on cancellous and cortical bone in ovariectomized ewes: a biochemical, histomorphometric, and densitometric study. *Journal Bone Mineral Research*, **16**, 89-96.
- CHRISTGAU S, ROSENQUIST C, ALEXANDERSON P, BJARNASON NH, RAVN, P, FLEDELIUS C, HERLING C, QVIST P, CHRISTIANSEN C (1998) Clinical evaluation of the Serum CroosLaps One Step Elisa, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clinical Chemistry* **44**, 2290-2300.
- COLEMAN RE (1994) The clinical use of bone resorption markers in patients with malignant bone disease. *Cancer*, **94**, p.2521-2533.
- COSTA FS Tirotoxicose experimental em gatos: Efeitos sobre o tecido ósseo, níveis séricos de fosfatase alcalina e metabolismo de cálcio e fósforo. Botucatu, 2002. 101p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista de Botucatu - SP.
- DELAURIER A, JACKSON B, PFEIFFER D, INGHAM K, HORTON MA, PRICE, JS (2004) A comparison of methods for measuring serum and urinary markers of bone metabolism in cats. *Research Veterinary Science* **77**, 29-39.
- DELMAS PD (2001) Bone marker nomenclature. *Bone* **28**, 575.
- DELMAS PD, EASTELL R, GARNERO P, SEIBEL MJ, STEPAN J (2000) Radioimmunoassay for the pyridoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen turnover. *Osteoporosys Internacional* **11** (supll), S2-S17.
- DELMAS PD, GINEYTS E, BERTHOLIN A, GARNERO P, MARCHAND F (1993) Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget's disease. *Journal Bone Mineral Research* **8**, 643-648.
- EASTELL R, DELMAS PD, HODGSON SF, ERIKSEN EF, MANN KG, RIGGS BL (1998) Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment

with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism* **67**, 741-748.

EBELING PR, PETERSON JM, RIGGS BL (1992) Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *Journal Bone Mineral Research* **7**, 1243-1250.

ERIKSEN EF, CHARLES P, MELSEN F (1993) Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation to bone histomorphometry. *Journal Bone Mineral Research* **8**, 127-132.

FOX DB, COOK JL (2001) Synovial fluid markers of osteoarthritis in dogs. *Journal American Veterinary Medical Association* **219**, 756-761.

FROST HM (1992) Perspectives: bone's mechanical usage windows. *Bone Mineral* **19**, 257-271.

GARZOTTO CK, BERG J, HOFFAMANN WE, RAND WM (2000) Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. *Journal Veterinary Internal Medicine* **14**, 587-592.

GUNDBERG CM, HAUSCHKA PV; LIAN JB, GALLOP PM (1984) Osteocalcin: isolation, characterization and detection. *Methods in Enzymology* **107**, 516-544.

HANSON DA, WEIS MAE, BOLLEN AM (1992) A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptide in urine. *Journal Bone Mineral Research* **7**, 1251-1258.

HAUSCHKA PV, WIANS FH (1989) Osteocalcina – hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anatomical Record* **224**, 180-188.

HOLTENIUS K, EKELUND A (2005) Biochemical markers of bone turnover in the dairy cow during lactation and dry period. *Research Veterinary Science* **78**, 17-19.

JOHNSON RB, GILBERT JA, COOPER RC, DAÍ X, NEWTON BI, TRACY RR, WEST WF, DEMOSS TL, MYERS PJ, STRECKFUS CF (1997) Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. *Journal Periodontology* **68**, 864-871.

LEONARD CA, TILLSON M (2001) Feline lameness. *Veterinary Clinicians North American Small Animal Practice* **31**, 143-163.

LIESEGANG A, EICHER R, SASSI ML, RISTELI J, KRAENZLIN M, RIOND JL, WANNER M (2000) Biochemical markers of bone formation and resorption

around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. *Journal Dairy Science* **83**, 1773-1781.

LINKHART SG, LINKHART TA, TAYLOR AK (1993) Synthetic peptide-based immunoassay for amino-terminal propeptide of type I procollagen: application for evaluation of bone formation. *Clinical Chemistry* **39**, 2254-2258.

MELKKO J, NIEMI S, RISTELI L, RISTELI J. Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. *Clinical Chemistry* **36**, 1328-1332.

NIELSEN HK (1994) Circadian and circatrigean changes in osteoblastic activity assessed by serum osteocalcin. *Danish Medical Bulletin* **41**, 216- 227.

PARFITT AM, SIMON LS, VILLANUEVA AR, KRANE SM (1987) Procollagen type I carboxy terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *Journal Bone Mineral Research* **2**, 427-436.

PHILIPPOV JP, PASCALEV MD, AMINKOV BY, GROSEV CD (1995) Changes in serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen in an experimental model of canine osteomyelitis. *Calcified Tissue Internacional* **57**, 152-154.

PRICE JS, JACKSON B, EASTELL R, GOODSHIP AE, BLUMSOHN A, WRIGHT, I, STONEHAM S, LANYON LE, RUSSEL RG Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Equine Veterinary Journal* **27**, 201-207.

PRICE JS, JACKSON B, GRAY JA, HARRIS PA, WRIGHT I, PFEIFFER DU, ROBINS SP, EASTELL R, RICKETTS SW (2001) Biochemical markers of bone metabolism in growing throughbreds: a longitudinal study. *Research Veterinary. Science* **71**, 37-44.

RAHAL S C, MORTARI A C, CAPORALI E H G, VULCANO LC, SANTOS FAM, TAKARIRA RK, CROCCI AJ (2002) Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. *Ciência Rural* **32**, 421-425.

RAISZ LG (1999) Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clinical Chemistry* **45**, 1353-1358.

REMES T, VÄISÄNEN SB, MAHONEN A, HUUSKONEN J, KRÖGER H, JURVELIN JS, PENTILÄ IM, RAURAMAA R (2004) The association of bone

metabolism with bone mineral density, serum sex hormone concentrations, and regular exercise in middle-aged men. *Bone*, **34**, 439-447.

RISTELI J, ELOMA AS, TRIVEDI P, MÅENTAUSTA O, ROWE DW (1993). Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone resorption. *Clinical Chemistry*, **39**, 635-640.

ROBINS SP (1995) Collagen crosslinks in metabolic bone disease *Acta Orthop Scandinavian* **66**, 171-175.

SCHARLA SH, WOLF S, DÜLL R, LEMPERT UG (1999) Prevalence of low bone mass and endocrine disorders in hip fracture patients in Southern Germany. *Exp. Clinical Endocrinology Diabetes* **107**, 547-554.

SEIBEL MJ (2000) Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporosis Internacional*, **11**, 18-29.

SWAMINATHAN R (2001) Biochemical markers of bone turnover. *Clinical Chimestry Acta* **313**, 95-105.

THIEDE MA, SMOCK SL, PETERSEN DN, GRASSER WA, THOMPSON DD, NISHIMOTO SK (1994) Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megacariócitos and peripheral blood platelets. *Endocrinology*, **135**, 929-937.

TRIVEDI P, RISTELI J, RISTELI L (1991) Serum concentrations of the type I and III procollagen propeptides as biochemical markers of growth velocity in healthy infants and children and in children with growth disorders. *Pediatr Research* **30**, 276-280.

VULCANO L (2001) Determinação e padronização dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) do carpo acessório de eqüinos em crescimento da raça Puro Sangue Inglês (PSI) por meio da densitometria óptica radiográfica. Botucatu, 52p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

VULCANO LC, LEAL ACR, LOUZADA MJQ., MUNIZ LMR, MAMPRIM MJ (1998) Determination of the normal values of density of the radius in Rottweilers, using radiographic otical densitometry (experimental study). In: *CONGRESSO MUNDIAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DE PEQUENOS ANIMAIS* Buenos Aires, Anais.

WATTS NB (1999) Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clinical Chemistry*, **45**, 1359-1368.

WEILER HA, WANGZ, ATKINSON SA (1995) Dexamethasone treatment impairs calcium regulation and reduces bone mineralization in infant pigs. *American Journal Clinical Nutrition* **61**, 805-811.

Tabela 1: Concentração sérica da osteocalcina (OC) e do telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP), e os valores em milímetros de alumínio (mmAl) da densidade mineral óssea em gatos saudáveis (n=14).

	Média ± DP	Intervalo
DMO (mmAl)	1,40 ± 0,23	1,03-1,68
OC (ng/mL)	0,15 ± 0,03	0,12-0,19
ICTP (ng/mL)	8,59 ± 5,78	1,51-9,92

Tabela 2. Correlação entre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e densidade mineral óssea em gatos saudáveis (n=14).

	DMO	OC	ICTP
DMO	-	-0,15	-0,06
OC	-	-	-0,21
ICTP	-	-	-

Trabalho 2

A ser encaminhado para o periódico Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria
Zootecnia

ISSN: 0102-0935

Endereço:

Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567

CEP: 30123-970

Belo Horizonte MG Brasil

Normas para publicação disponível em:

<http://www.scielo.br/revistas/abmvz/pinstruc.htm>

Homeostase do Cálcio no Hipertireoidismo Felino

Calcium homeostasis in feline hyperthyroidism

Mauro José Lahm CARDOSO¹, Fabiano Séllos COSTA²,
Lucy Marie Ribeiro MUNIZ³, Maria Aparecida VALÉRIO⁴

Fonte Financiadora: FAPESP

1-Departamento de Patologia Geral - Fundação Faculdades Luiz Meneghel (FFALM) – UNESPAR – Bandeirantes – PR/ Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Campus Botucatu.

Adress: Hospital Veterinário - FFALM BR 369 Km 54

Caixa Postal 261

86360-000 Bandeirantes – PR

maurolahm@ffalm.br

2-Departamento de Medicina Veterinária, CCA – UFES – Alegre – ES/
Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP,
Campus Botucatu.

3-Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP,
Campus Botucatu.

4-DEDAG - Fundação Faculdades Luiz Meneghel (FFALM) – UNESPAR –
Bandeirantes – PR/

Resumo

Os efeitos do hipertireoidismo experimental (150 µg/kg/dia/42 dias) na homeostase do cálcio foram estudados em 14 gatos sem raça definida, com idade entre um e três anos. As variáveis estudadas foram tiroxina total (T4), tiroxina livre (FT4), paratormônio (PTH), cálcio total e ionizado, fósforo e densidade mineral óssea (DMO). Houve uma clara tendência de aumento das concentrações séricas de PTH intacto a partir do momento inicial (M0), com diferença significativa das concentrações e as obtidas aos 14 (M1), 28 (M2) e 42 (M3) dias. Entretanto, não houve diferença significativa entre as concentrações séricas aos 14, 28 e 42 dias. O cálcio ionizado demonstrou uma diminuição significativa de M0 para M1 e de M1 para M3. Os hormônios tireoidianos apresentaram correlação positiva com o PTH e negativa com o cálcio ionizado. Já a DMO apresentou tendência de correlação negativa com o PTH a partir de M2 e com o fósforo somente em M2, com as demais variáveis não se observou correlação. Observou-se correlação negativa do PTH com o cálcio ionizado em M1, M2 e M3. Conclui-se que o hipertireoidismo em gatos adultos jovens sem doenças concomitantes está associado ao hiperparatireoidismo secundário devido ao aumento do PTH e diminuição do cálcio ionizado. Os efeitos combinados dos hormônios tireoidianos e do PTH contribuíram para a diminuição da DMO.

Palavras-chave: hipertireoidismo, cálcio, fósforo, PTH, gatos

Abstract

The effect of experimental hyperthyroidism (150 µg/kg/day/42 days) on calcium homeostasis was studied in fourteen shorthairrats between one and three years of age. Total thyroxine (T4), free thyroxine (FT4), parathyroid hormone (PTH), total and ionized calcium, phosphorus bone mineral density (DMO) were measured. Serum concentrations of unbroken PTH had a clear trend of increase from the initial moment, with significant differences from this point to the 14, 28 and 42 days. However, no significant differences on serum concentrations were observed among the 14, 28 and 42 days. The ionized

calcium significantly decreased from M0 to M1 and from M1 to M3. Thyroid hormones positively correlated with PTH and negatively with ionized calcium. However, DMO only presented a tendency of negative correlation with PTH from M2 to M3 and with phosphorus only in M2, with no correlation with other variables. Negative correlation of PTH with calcium ionized was observed in M1, M2 and M3. In conclusion, hyperthyroidism in young adult cats without concomitant illnesses is associated to secondary hyperparathyroidism due to increase on PTH and decrease on ionized calcium. The combined effects of thyroid hormones and PTH contributed to the reduction of DMO.

Keywords: hyperthyroidism, calcium, phosphorus, PTH, cats

Introdução

O hipertireoidismo felino é a doença endócrina mais comum de gatos domésticos adultos-velhos nos Estados Unidos e Reino Unido (Mooney et al., 1996a,b; Mooney, 2001). O hipertireoidismo (tireotoxicose) é uma alteração clínica multissistêmica resultante de excessivas concentrações dos hormônios tireoidianos, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). As ações metabólicas multissistêmicas provocam alterações cardiovasculares, digestórias e esqueléticas (Peterson et al., 2001).

Tanto o excesso da produção endógena dos hormônios da tireóide, como as instituições da terapia convencional com levotiroxina podem proporcionar o aparecimento de sinais clínicos de tireotoxicose (Fallon et al., 1983; Adlin et al., 1991; Diamond et al., 1991; Cardoso, 2002).

Aumentos da FA óssea, da osteocalcina, do cálcio e do fósforo são achados comuns associados ao aumento do metabolismo ósseo secundário aos efeitos ósseos dos hormônios tireoidianos em humanos (Rhone et al., 1980) e em gatos (Archer & Taylor, 1996; Barber & Elliot, 1996). A diminuição da densidade mineral óssea em humanos hipertireóides foi descrita em diversos estudos (Allain & McGregor, 1992), porém em gatos há somente um trabalho descrevendo a diminuição da densidade mineral óssea secundária ao hipertireoidismo (Costa, 2002).

A hiperfosfatemia em gatos com hipertireoidismo foi observada em dois estudos (Peterson et al., 1983; Barber & Elliot, 1996). Em um destes estudos se identificou a diminuição nos valores de cálcio ionizado e, associado às alterações do cálcio e fósforo, havia também aumento nas concentrações do PTH (Barber & Elliot, 1996). Neste mesmo estudo não se observou correlação significativa entre o PTH e a T4, mas o PTH apresentou correlação significativa com a concentração do fósforo, onde 20% da variabilidade na concentração do PTH é devido às alterações do fósforo plasmático.

O hipertireoidismo é uma causa bem conhecida de alteração do metabolismo ósseo, caracterizado por aumento na atividade osteoblástica e osteoclástica com predomínio da reabsorção óssea e resultando em diminuição na massa óssea (Mosekilde et al., 1990; Garner et al., 1994). A taxa de renovação óssea é refletida no sangue e na urina pela alteração dos níveis de

enzimas, minerais e outras substâncias envolvidas na deposição e reabsorção ósseas. (Fraser et al, 1971).

A tiroxina tende a diminuir a absorção do cálcio intestinal, entretanto os valores podem estar aumentados devido ao estímulo à osteólise. O excesso dos hormônios tireoidianos exerce um efeito direto sobre o metabolismo ósseo, parecendo estimular diretamente a reabsorção óssea. O aumento da retirada de cálcio do tecido ósseo induz, de forma compensatória, a um decréscimo da secreção do PTH, na tentativa de manter os níveis séricos de cálcio normais (Mosekilde & Christensen, 1977; Peterson et al., 1983). Segundo Mosekilde et al. (1990), a diminuição dos níveis séricos do PTH circulante estão correlacionados ao aumento na taxa de reabsorção tubular de fosfato. Este parece ser o fator de maior importância para justificar um aumento sérico dos níveis de fósforo; entretanto, um aumento da mobilização de fósforo de origem óssea e dos tecidos moles também pode contribuir para este acontecimento. Segundo Beigel et al. (1983), o hipertireoidismo é capaz de influenciar no metabolismo do cálcio aumentando a atividade osteoclástica e proporcionando aumento da reabsorção óssea e, também, promover um decréscimo da absorção do cálcio intestinal e hipercalciúria, entretanto, a maioria dos pacientes tende a apresentar valores dentro dos padrões de normalidade.

A determinação da densidade mineral óssea é um fator fundamental para a definição do quadro de desmineralização, servindo também para o estabelecimento de um protocolo terapêutico e o monitoramento dos pacientes acometidos, podendo desta forma prevenir a ocorrência de fraturas patológicas (Scharla et al., 1999). Diferentes técnicas densitométricas são descritas na medicina veterinária e humana, visando proporcionar precisão nos dados e boas condições de trabalho. Inúmeros relatos demonstram que a técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas é útil para avaliação da densidade mineral óssea, pois se apresenta com alta precisão, tendo o seu uso uma importância destacada (Gallo et al., 1996; Louzada et al., 1996; Rahal et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre os indicadores do hiperparatireoidismo (fósforo, cálcio ionizado e paratormônio) e a densitometria mineral óssea em gatos com hipertireoidismo experimental.

Material e Métodos

Foram utilizados 14 gatos sem raça definida, nove fêmeas e cinco machos, não castrados, com idade entre um e três anos. O estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP, Botucatu, SP.

Os animais foram mantidos em jaulas individuais de ferro esmaltado, alimentados com ração seca comercial e água a vontade. Os estudos se iniciaram após um período de 15 dias de adaptação dos gatos ao ambiente e manejo. No início deste período os animais foram vacinados, vermifugados e estavam livres de ectoparasitas.

A tireotoxicose foi induzida pela administração oral, de comprimidos, de levotiroxina sódica (150µg/kg/dia) durante 42 dias.

Os animais foram avaliados em quatro momentos (M), sendo que o momento inicial (M0), feito antes da administração da levotiroxina sódica, resultou nos valores basais dos diversos parâmetros estudados: aos 14 dias (M1), aos 28 dias (M2) e aos 42 dias (M3). As colheitas de sangue, para obtenção do soro foram realizadas entre 9 e 10 horas da manhã, cerca de três a quatro horas após a administração da levotiroxina sódica, pois é nesse tempo que ocorre o pico de concentração da tiroxina em gatos (Hays et al., 1992). Além disso, o meio da manhã é o horário preferível para a colheita de sangue para a mensuração do PTH em felinos (Barber, 2004) e, este horário, minimiza a variação no padrão de secreção dos marcadores do metabolismo ósseo.

Colheita das amostras

As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular dentro de tubos contendo gel ativador de coágulo. Os tubos foram centrifugados a 2000g por 10 minutos em menos de uma hora pós-colheita. Após a separação do soro as amostras foram aliqüotadas em cinco frascos de 1,2 mL e congeladas em freezer a -70°C até o momento da realização dos testes. As amostras para dosagem do cálcio ionizado foram colhidas de sangue arterial dentro de tubos heparinizados em anaerobiose.

Perfil Bioquímico Sérico

As mensurações séricas do cálcio total e fósforo foram realizadas utilizando aparelho multicanal automatizado para as análises bioquímicas (Hitachi 911).

Cálcio Ionizado

O cálcio ionizado foi mensurado utilizando-se aparelho de hemogasimetria.

Mensuração da Tiroxina Total (TT4) e da Tiroxina Livre (FT4)

A mensuração das concentrações séricas da TT4 e FT4 foi realizada pela técnica de RIE em fase sólida, utilizando kit comercial (Coat-Count Total T4 e Coat-Count Free T4, DPC, Los Angeles, USA). O protocolo recomendado pelo fabricante para a realização das mensurações não foi alterado.

Mensuração do PTH Intacto

A mensuração do PTH intacto foi realizada usando-se de kit comercial para o teste RIMA (PTH Intacto, DSL, Texas, USA). O protocolo recomendado pelo fabricante para a realização das mensurações não foi alterado.

Coefficiente de Variação

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da mensuração em duplicata das amostras foram usados para a determinação da precisão intra-ensaio dos hormônios e dos marcadores do metabolismo ósseo séricos. Para a determinação da precisão foram feitos "pool" (n=16) de cada momento. Cada "pool" foi testado seis vezes dentro do mesmo teste. A média, o desvio padrão e o CV foram determinados para cada "pool" e a média do CV dos momentos foi definido como a precisão inter-ensaio dos hormônios e dos marcadores do metabolismo ósseo séricos.

Densitometria Mineral Óssea

A avaliação da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio direito foi realizada pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas, conforme descrito na literatura (Rahal et al., 2002), nos quatro momentos. Para melhor análise seqüencial dos valores densitométricos, padronizou-se a seleção da região da metáfise localizada 5 mm acima da cicatriz epifisária. Para cada momento e animal se fez três radiografias, realizaram-se três leituras densitométricas em cada radiografia, totalizando nove valores de densidade mineral óssea. O valor densitométrico final, para

cada animal nos diferentes momentos, foi obtido por meio do cálculo da média dos nove valores.

Análise Estatística

A análise estatística das variáveis ao longo dos diferentes momentos foi realizada considerando-se a técnica de análise de variância para medidas repetidas, teste de Fisher e teste de Tukey. Para a interpretação das letras, deve-se considerar que duas médias seguidas pelo menos de uma mesma letra não diferem ao nível de 5% de significância. Para o estudo da correlação entre as variáveis em cada um dos momentos, utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson.

Resultados

Os resultados das concentrações séricas dos hormônios tireoidianos, do PTH, do cálcio total, do fósforo, cálcio ionizado e a DMO estão descritos na Tabela 1.

Os kits de TT4, FT4 e PTH intacto conservaram a capacidade de detecção nas amostras felinas e todos os valores estavam dentro da margem de detecção dos kits, sem a necessidade de diluição das amostras.

Concentração sérica de TT4: Houve uma clara tendência de aumento das concentrações séricas de TT4 a partir do momento inicial (Tabela 1). Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) na concentração de TT4 entre o M0 e os demais momentos e entre M1 e M3. Não houve diferença significativa entre M1 e M2 e entre M2 e M3.

Concentração sérica de FT4: Houve um aumento marcante das concentrações séricas de FT4 a partir do momento inicial (Tabela 1). Observou-se diferença significativa entre todos os momentos.

Concentração sérica de PTH Intacto: Houve uma clara tendência de aumento das concentrações séricas de PTH intacto a partir do momento inicial (Tabela 1) e diferença significativa entre este momento e os demais momentos. Enquanto que as mensurações realizadas aos 14, 28 e 42 dias não tiveram significativa entre si.

Concentração dos minerais sanguíneos: o cálcio total e o fósforo não apresentaram diferença significativa entre os momentos. Enquanto que o cálcio

ionizado demonstrou uma diminuição significativa entre M0 e M1 e entre M1 e M3.

Correlação entre as variáveis estudadas: as correlações entre as diversas variáveis estudadas estão dispostas na Tabela 2. Em M0 somente o cálcio total apresentou correlação positiva com o PTH. A DMO apresentou tendência de boa correlação negativa com o PTH a partir de M2 e com o fósforo somente em M2, com as demais variáveis não se observou correlação. Observou-se correlação negativa do PTH com o cálcio ionizado em M1, M2 e M3.

Coeficiente de Variação

O coeficiente de variação (CV) da TT4, FT4 e PTH estão descritos na Tabela 3. O CV das amostras medidas em duplicatas foi usado para a determinação da precisão intra-ensaio. A média do CV do "pool" dos quatro momentos foi definida como a precisão inter-ensaio para todas as variáveis.

Discussão

Até o momento os autores desconhecem outros estudos realizados em gatos com hipertireoidismo que correlacionassem as alterações na homeostase do cálcio com a densitometria mineral óssea. Na presente pesquisa, os gatos com hipertireoidismo tiveram alteração significativa na homeostase do cálcio. As variáveis que tiveram alteração foram o cálcio ionizado e o PTH. Os animais tiveram aumento significativo nas concentrações séricas do PTH em M1 em relação à M0 e contínuo aumento até M3, porém sem diferença estatística. É importante salientar que os valores do PTH sérico na maioria dos gatos permaneceram dentro dos valores de referência (2,9-26,3 pg/mL) (Barber et al., 1993; Barber & Elliott, 1996), somente um gato apresentou valor, aos 28 dias, do PTH intacto (28,18 pg/mL) acima dos valores de referência. Estes achados sugerem que o hipertireoidismo pode provocar aumento nas concentrações do PTH sérico. Barber & Elliott (1996) encontraram aumento do PTH em 77% dos gatos com hipertireoidismo espontâneo. O fato de não ter ocorrido hiperfosfatemia, provavelmente, contribuiu para baixa elevação do PTH, pois se sabe que níveis elevados de fósforo são importantes para a secreção do PTH (Barber & Elliot, 1996).

O PTH somente apresentou correlação positiva com a TT4 em M1, enquanto a FT4 não apresentou em nenhum momento. A correlação ocorreu no mesmo momento em que o PTH apresentou aumento significativo nas concentrações em relação ao M0, sugerindo que houve influência dos hormônios tireoidianos nas concentrações de PTH. A falta de correlação entre os hormônios tireoidianos e o PTH em todos os momentos já era esperado, tendo em vista que os hormônios tireoidianos demonstram variações periódicas nas suas secreções e conseqüentemente ns suas concentrações (Broome et al., 1987). A realização das colheitas sempre no mesmo horário tentou minimizar um pouco este efeito.

Não foi observada variação significativa do fósforo sérico durante o estudo e não se detectou hiperfosfatemia. Estes achados diferem de outros estudos com gatos hipertireóideos que apresentavam 21% (Peterson et al., 1983) e 43% dos animais com hiperfosfatemia (Barber & Elliot, 1996). Sabe-se que o aumento do remodelamento ósseo que ocorre no hipertireoidismo em humanos geralmente é acompanhado por hipercalcemia e hiperfosfatemia leve (Mosekilde & Christensen, 1977). A razão da ausência da hiperfosfatemia não foi determinada neste estudo, visto que ocorreu reabsorção óssea demonstrada pelos achados densitométricos e isto é uma das fontes da elevação do fósforo no hipertireoidismo (Barber & Elliott, 1996). Sabe-se que a reabsorção de fósforo nos túbulos renais é processo saturável, onde o transporte máximo depende da ingestão dietética, das concentrações séricas do PTH e dos hormônios tireoidianos (Cheng et al., 1985). Os hormônios tireoidianos atuam diretamente nos túbulos proximais aumentando a reabsorção de fósforo (Yusufi et al., 1985), enquanto que o PTH atua no aumento da fosfatúria (Bernt & Knox, 1980), entretanto, não são conhecidas as respostas dos gatos à fosfatúria (Barber & Elliott, 1996). Os resultados desta pesquisa sugerem que os efeitos do PTH na excreção do fósforo urinário tenham sido superiores aos efeitos da TT4 e FT4 na reabsorção, por isso não ocorreu hiperfosfatemia. Para confirmar esta hipótese teria sido necessário a monitoramento da excreção do fósforo, o que não foi realizado.

No presente estudo os valores do cálcio total não apresentaram variação significativa entre os momentos, provavelmente por não refletirem o *status* do cálcio ósseo (Barber, 2004). Já o cálcio ionizado apresentou redução

significativa entre os momentos estudados, mas os valores permaneceram dentro do limite normal da espécie (1,19 a 1,33 nmol/L). Esta redução do cálcio ionizado é semelhante à obtida em outro estudo (Barber & Elliott, 1996), entretanto estes resultados diferem da hipercalcemia que acompanha o hipertireoidismo em humanos (Iqbal et al., 2003; Mohan et al., 2004).

A redução do cálcio ionizado também já foi descrita, no entanto a causa da hipocalcemia não foi comprovada (Barber & Elliott, 1996). A presença de correlação inversa entre o cálcio ionizado e o fosfato a partir de M1 sugere que o fósforo liberado da reabsorção óssea foi suficiente para causar hipocalcemia sem causar hiperfosfatemia. Os animais apresentaram correlação negativa com o PTH de M1 a M3, sugerindo que queda significativa do cálcio ionizado a partir de M1 contribuiu para o aumento na secreção do PTH, já que a diminuição do cálcio ionizado é o principal estimulante da secreção do PTH com o objetivo de manter a homeostase do cálcio (Barber, 2004). Além disso, foi demonstrado que a correlação inversa entre o PTH e o cálcio ionizado ocorre somente na hipercalcemia ou na hipocalcemia, mas também contribui para o “set-point” da regulação na secreção do PTH (Brown, 1983). O cálcio ionizado é responsável pela mudança do “set-point” da regulação na secreção do PTH, mesmo quando a concentração de cálcio é normal (Barber, 2004).

Neste estudo houve uma diminuição significativa na DMO em M1 em comparação com M0 e um decréscimo gradual dos valores médios da densidade mineral óssea nos demais momentos. A diminuição da DMO ou a osteopenia é freqüente em humanos com hipertireoidismo, mas foi pouco relatada em animais (Kung & Ng, 1994; Gouveia et al., 1997; Costa, 2002). Em humanos recebendo reposição hormonal com levotiroxina se observa diminuição da DMO, sugerindo que o hipertireoidismo subclínico pode acelerar a perda óssea (Diamon et al., 1990). Portanto pode-se inferir que o mesmo ocorreu nos gatos estudados com hipertireoidismo clínico.

Não foi observada boa correlação entre a densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio e os níveis plasmáticos de T4 livre e T4 total em todos os momentos. As baixas correlações dos hormônios tireoidianos com a DMO sugerem que os efeitos da TT4 e FT4 sobre a reabsorção óssea foi inferiores ao exercido pelo PTH, entretanto se sabe que os hormônios tireoidianos possuem efeitos poderosos nos ossos, favorecendo a reabsorção

óssea e conseqüentemente a osteopenia (Fraser et al., 1971; Mosekilde et al., 1990).

Esperava-se que houvesse correlação negativa entre o cálcio ionizado e a DMO, sugerindo a perda de massa óssea, mas isto não ocorreu. A correlação negativa entre a DMO e as concentrações séricas de PTH em M2 e M3 sugerem que o PTH contribui para a diminuição da DMO. Mesmo com as concentrações séricas do PTH permanecendo dentro dos valores de referência (2,9-26,3 pg/mL) (Barber et al., 1993; Barber & Elliott, 1996) observa-se um aumento fisiológico em suas concentrações o que bastou para provocar reabsorção óssea.

Como existem semelhanças nas alterações no tecido ósseo na tireotoxicose de origem exógena e endógena em humanos, conforme descrito em mulheres submetidas a uma reposição hormonal excessiva (Kung & Ng, 1994), sugere-se que o mesmo possa ocorrer em gatos. Portanto, possivelmente a perda de massa óssea, observada neste estudo, também ocorrerá de forma semelhante no hipertireoidismo felino de origem endógena. Em humanos o hipertireoidismo é mais um fator de risco de osteoporose (Jódar et al., 1997), visto que os hormônios tireoidianos proporcionam uma maior fragilidade do osso e com isso aumenta o risco de fraturas patológicas decorrentes da osteoporose (Jódar et al., 1997; Scharla et al., 1999). Nos gatos utilizados nesta pesquisa, esse fator agravante não ocorreu durante o período experimental, acredita-se que se o mesmo fosse prolongado as fraturas patológicas poderiam vir a acontecer.

O hiperparatireoidismo secundário ao hipertireoidismo em felinos pode ter implicações nos ossos longos, mas isto não foi comprovado nesta pesquisa. Provavelmente, as alterações nos ossos longos ocorram na doença crônica ou também sofra influência de fatores extra tireoidianos. Portanto, há necessidade de outros estudos e mais prolongados para compreender os efeitos do hipertireoidismo felino na homeostase do cálcio.

Os resultados obtidos sugerem que gatos adultos jovens com hipertireoidismo sem a presença de doenças concomitantes desenvolvem hiperparatireoidismo secundário, semelhantes às descrições anteriores (Barber & Elliott, 1996). Um fator importante a salientar é o fato de a doença

espontânea ocorrer em gatos velhos, ou seja, na mesma faixa etária em que há maior ocorrência da insuficiência renal.

Conclusões

O hipertireoidismo em gatos adultos jovens sem doenças concomitantes apresentou hiperparatireoidismo secundário sem a presença de hiperfosfatemia; mas com aumento do PTH e diminuição do cálcio ionizado. Os efeitos combinados dos hormônios tireoidianos e do PTH contribuíram para a diminuição da DMO.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, P., JOWSEY, J. Bone and mineral metabolism in hyperthyroidism: an experimental study. *Endocrinology*, v.81, p.735-40, 1966.
- ADLIN, E. V., MAURER, A. H., MARKS, A. D., CHANNIICK, B.J. Bone mineral density in postmenopausal women treated with L-Thyroxine. *Am. J. Med.*, v.90, p.360-6, 1991.
- ALLAIN, T.J., MCGREGOR, A.M. Thyroid hormones and bone. *J.Endocrinology*, v.139, p.9-18,1992.
- ARCHER, J.T., TAYLOR, S.M. Alkaline phosphatase bone isoenzyme and osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. *Can. Vet. Journal*, v.37, p.735-739, 1996.
- BARBER P. J., ELLIOT, J. Study of calcium homeostasis in feline hyperthyroidism. *J. Small Animal Practice*, v.37, p.575-82, 1996.
- BARBER, P.J. Disorders of the parathyroid glands. *J. Feline Medicine Surgery*, v.6, p.259-269, 2004.
- BARBER, P.J., ELLIOT, J., TORRANCE, A.G. Measurement of feline intact parathyroid hormone: assay validation and sample handling studies. *J. Small Animal Practice*, v.34, p.614-620, 1993.
- BEIGEL, Y., ARIE, R., WYSENBECK, A. J., HALABE, E., BLUM, I. Hypocalcaemia, a possible manifestation of thyrotoxicosis. *Postgraduate Medical J.*, v.59, p.317-9, 1983.
- BRENT, T.J., KNOX, F.G. Effects of parathyroid hormone and calcitonina on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Clinical Endocrinol. Metab.*, v.51, p.473-478, 1980.

BROOME, M.R., HAYS, M.T., TURREL, J.M. Peripheral metabolism of thyroid hormones and iodide in healthy and hyperthyroid cats. *Am. J. Vet. Res.*, v.48, p.1286-9, 1987.

BROWN, E.M. Four-parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J. Clinical Endocrinol. Metab.*, v.56, p.572-581, 1983.

CARDOSO, M.J.L. Avaliação dos efeitos cardíacos, radiográficos, eletrocardiográficos, do hemograma e nos níveis séricos de uréia, creatinina, sódio, potássio e enzimas hepáticas, em gatos com hipertiroidismo experimental. Botucatu: UNESP, 2002, p.174, Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

CHENG, L., DERSCH, C., KRAUS, E., SPECTOR, D., SACKTOR, B. Renal adaptation to phosphate load in the acutely thyroparathyroidectomized rat: rapid alteration in brush border membrane phosphate transport. *American J. Physiology*, v.246, p.F488-F494, 1984.

COSTA, F.S. Tirotoxicose experimental em gatos: Efeitos sobre o tecido ósseo, níveis séricos de fosfatase alcalina e metabolismo de cálcio e fósforo. Botucatu, 2002. 101p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista de Botucatu - SP.

DIAMOND, T., NERY L., HALES, I. A therapeutic dilemma: suppressive doses of thyroxine significantly reduce bone mineral measurements in both premenopausal and postmenopausal women with thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.72, n.1, p.184s, 1991.

FRASER, S. A., SMITH, D. A., ANDERSON, J. B. WILSON, G. M. Osteoporosis and fractures following thyrotoxicosis. *Lancet*, p.981-3, 1971.

GALLO, R. N., RAHAL, S. C., VULCANO, L. C. LOUZADA, M. J. KQ. Avaliação da densidade óssea em gatos em crescimento submetidos a dois tipos de ração. In: XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, 1996, Campo Grande. Anais... Campo Grande, MS. 1996.

GARNERO, P., VASSY, V., BERTHOLIN, A., RIOU, J.P., DELMAS, P.D. Markers of bone turnover in hyperthyroidism and the effects of treatment. *J. Clinical Endocrinol. Metab.*, v.78, n.4, p.955-959, 1994.

- GOUVEIA, C. H. A., JORGETTI, V., BIANCO, A.C. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J. Bone Miner. Res.*, v.12, p.2098-107, 1997.
- HAYS, M.T.; HSU, L.; KOHATSU, S. Transport of the thyroid hormones across the feline gut wall. *Thyroid*, v.2, p.45, 1992.
- IGBAL, A.A., BURGESS, E.H., GALLINA, D.L., NANES, M.S., COOK, C.B. Hypercalcemia in hyperthyroidism: patterns of serum calcium, parathyroid hormone, and 1,25-dihydroxyvitamin D3 levels during management of thyrotoxicosis. *Endocr Pract.*; v.9, n.6, p.:517-21, 2003.
- JÓDAR, E., MUÑOZ-TORRES, M., ESCOBAR-JIMÉNEZ, F., QUESADA, M., LUNA, J.D., OLEA, N. Antiresorptive therapy in hyperthyroid patients: longitudinal changes in bone and mineral metabolism. *J. Clinical Endocrinol. Metab.*, v.82, n.6, p.1989-1994, 1997.
- KUNG, A. W., NG, F. A rat model of thyroid hormone-induced bone loss: effect of antiresorptive agents on regional bone density and osteocalcin gene expression. *Thyroid*, v.4, n.1, p.93-8, 1994.
- LOUZADA, M. J. Q., BELANGERO, W. D., PELÁ, C. A., SANTOS - PINTO, R. Avaliações da densidade óssea em radiografias – I metodologia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA, 30, 1996, Curitiba. *Anais*.
- MOHAN, H.K., GROVES, A.M., FOGELMAN, I., CLARKE, S.E. Thyroid hormone and parathyroid hormone competing to maintain calcium levels in the presence of vitamin D deficiency. *Thyroid*, v.14, v.p, p.789-91, 2004.
- MOONEY, C.T, THODAY, K.L., DOXEY, D.L. Serum thyroxine and triiodothyronine responses of hyperthyroid cats to thyrotropin. *Am. J. Vet. Res.*, v.57, p.987-91. 1996a.
- MOONEY, C.T. Feline hyperthyroidism: diagnosis and therapeutics. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 31, p.963-83, 2001.
- MOSEKILDE, L., CHRISTENSEN, M. S. Decreased parathyroid function in hyperthyroidism: interrelationships between serum parathyroid hormone, calcium-phosphorus metabolism and thyroid function. *Acta Endocrinologica*, v. 84, p.566-75, 1977.

MOSEKILDE, L., ERIKSEN, E. F., CHARLES, P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol. Metab. Clinics North America*, v.19, n.1, p.35-63, 1990.

PETERSON, M. E., KINTZER, P. P., CAVANAGH, P. G., FOX, P. R., FERGUSON, D. C., JOHNSON, G. F., BECKER, D. V. Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.183, n.1, p.103-10, 1983.

PETERSON, M.E., MELIÁN, C., NICHOLS, R. Measurement of serum concentrations free thyroxine, total thyroxine, and total triiodothyronine in cats with hyperthyroidism and cats with nonthyroidal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.218, p.529-536, 2001.

RHONE, D.P., BERLINGER, F.R., WHITE, F.M. Tissue sources of elevated serum alkaline phosphatase activity in hyperthyroid patients. *Am. J. Clin. Pathol.*, p.381-386, 1980.

SCHARLA, S. H., WOLF, S., DÜLL, R., LEMPERT, U. G. Prevalence of low bone mass and endocrine disorders in hip fracture patients in Southern Germany. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, v.107, p.547-54, 1999.

VULCANO, L.C.; LEAL, A.C.R.; LOUZADA, M.J.Q.; MUNIZ, L.M.R.; MAMPRIM, M.J. Determination of the normal values of density of the radius in Rottweilers, using radiographic optical densitometry (experimental study). In: *XXIII Congresso Mundial de Medicina Veterinária de Pequenos Animais*, Buenos Aires, Argentina, 1998.

YUSUFI, A.N.K., MURAYAMA, N., KELLER, M.J., DOUSA, T.P. Modulary effect of thyroid hormones on uptake of phosphate and other solutes across luminal brush border membrane of kidney cortex. *Endocrinology*, v.116, p.2438-2449, 1985.

Tabela 1: Valores séricos dos hormônios tireoidianos e do paratormônio (PTH), valores dos minerais sangüíneos e densidade mineral óssea em 14 gatos normais (M0) e após a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3). Valores são expressos como média \pm desvio padrão (intervalo).

	0 (M0)	14 dias (M1)	28 dias (M2)	42 dias (M3)
TT4 ($\mu\text{g/dL}$)	2,28 \pm 0,88 ^a (1,15-1,78)	8,12 \pm 4,27 ^b (1,14-14,64)	11,02 \pm 4,70 ^{bc} (1,76-18,78)	11,72 \pm 4,26 ^c (5,5-22,16)
FT4 (ng/dL)	1,38 \pm 0,25 ^a (1,05-1,89)	3,38 \pm 0,81 ^b (2,35-4,74)	6,93 \pm 1,28 ^c (5,18-9,36)	8,98 \pm 0,57 ^d (8,23-9,91)
DMO (mmAl)	1,40 \pm 0,23 ^a (1,03-1,68)	1,34 \pm 0,20 ^b (0,92-1,59)	1,31 \pm 0,20 ^b (0,90-1,51)	1,30 \pm 0,18 ^b (0,90-1,50)
PTH (pg/mL)	6,91 \pm 1,14 ^a (5,43-8,78)	15,09 \pm 3,34 ^b (11,37-20,81)	18,15 \pm 5,03 ^b (13,03-28,18)	18,95 \pm 3,29 ^b (14,30-24,30)
Cálcio Total (mg/dL)	9,77 \pm 0,67 ^a	9,69 \pm 0,37 ^a	9,90 \pm 0,53 ^a	9,71 \pm 0,50 ^a
Cálcio Ionizado (nmol/L)	1,31 \pm 0,02 ^a (1,27-1,34)	1,27 \pm 0,03 ^b (1,21-1,30)	1,25 \pm 0,04 ^{bc} (1,17-1,29)	1,25 \pm 0,03 ^c (1,20-1,29)
Fósforo (mg/dL)	6,03 \pm 0,90 ^a	6,49 \pm 1,00 ^a	6,48 \pm 0,86 ^a	6,51 \pm 0,60 ^a

Valores seguidos de mesmas letras nas linhas não diferem ($P > 0,05$)

Tabela 2: Correlação entre parâmetros bioquímicos, hormonais e densidade mineral óssea em 14 gatos normais (M0) e após a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3).

		TT4	FT4	DMO	PTH	Cálcio Total	Cálcio Ionizado	Fósforo
TT4	0	-	0,10	-0,30	0,41	0,42	-0,23	0,12
	14 dias	-	0,47	-0,28	0,62*	-0,08	-0,75*	0,53*
	28 dias	-	0,51*	0,09	0,31	0,12	-0,21	0,08
	42 dias	-	0,18	0,14	-0,14	-0,04	-0,03	0,46
FT4	0	-	-	-0,33	0,25	-0,15	0,42	0,11
	14 dias	-	-	0,05	0,21	-0,46	-0,20	0,51*
	28 dias	-	-	0,25	0,08	-0,07	-0,30	-0,31
	42 dias	-	-	0,15	0,11	-0,35	-0,15	-0,06
DMO	0	-	-	-	-0,01	0,25	-0,13	-0,36
	14 dias	-	-	-	-0,42	0,22	0,24	-0,20
	28 dias	-	-	-	-0,56*	-0,16	0,30	-0,50
	42 dias	-	-	-	-0,51*	-0,23	0,33	0,04
PTH	0	-	-	-	-	0,60	-0,15	0,08
	14 dias	-	-	-	-	-0,11	-0,80*	0,37
	28 dias	-	-	-	-	0,29	-0,75*	0,49
	42 dias	-	-	-	-	0,35	-0,79*	0,24
Cálcio Total	0	-	-	-	-	-	-0,24	0,12
	14 dias	-	-	-	-	-	-0,17	0,03
	28 dias	-	-	-	-	-	-0,22	0,23
	42 dias	-	-	-	-	-	-0,14	-0,16
Cálcio Ionizado	0	-	-	-	-	-	-	0,35
	14 dias	-	-	-	-	-	-	-0,50
	28 dias	-	-	-	-	-	-	-0,46
	42 dias	-	-	-	-	-	-	-0,50

*Presença de correlação estatisticamente significativa

Tabela 3: Precisão intra-ensaio e inter-ensaio das mensurações realizadas por RIMA e RIE em 14 gatos normais (M0) e após a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3).

Precisão intra-ensaio	
TT4	5,72
FT4	4,18
PTH	3,88
Precisão inter ensaio da TT4	6,89
M0	8,87
M1	6,47
M2	6,17
M3	7,05
Precisão inter ensaio da FT4	3,34
M0	6,47
M1	3,70
M2	1,60
M3	1,58
Precisão inter ensaio do PTH	2,68
M0	2,62
M1	1,07
M2	2,04
M3	4,98

Trabalho 3

A ser encaminhado para o periódico Journal Veterinary Medicine Series A
(Physiology, Pathology, Clinical Medicine)

ISSN: 0931-184X

Endereço:

Blackwell Verlag Gmbh

Kurfürstendamm 58

10707 Berlim

Germany

Normas para publicação disponível em:

<http://mc.manuscriptcentral.com/jva>

Marcadores séricos do metabolismo ósseo no hipertireoidismo felino

Serum markers of bone metabolism in feline hyperthyroidism

Mauro José Lahm CARDOSO¹, Fabiano Séllos COSTA²,
Lucy Marie Ribeiro MUNIZ³, Maria Aparecida VALÉRIO⁴

Fonte Financiadora: FAPESP

1-Departamento de Patologia Geral - Fundação Faculdades Luiz Meneghel (FFALM) – UNESPAR – Bandeirantes – PR/ Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Campus Botucatu.

Adress: Hospital Veterinário - FFALM BR 369 Km 54

Caixa Postal 261

86360-000 Bandeirantes – PR

maurolahm@ffalm.br

2-Departamento de Medicina Veterinária, CCA – UFES – Alegre – ES/
Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP,
Campus Botucatu.

3-Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP,
Campus Botucatu.

4-DEDAG - Fundação Faculdades Luiz Meneghel (FFALM) – UNESPAR –
Bandeirantes – PR/

Resumo

Os efeitos do hipertireoidismo experimental (150 µg/kg/dia/42 dias) sobre os marcadores do metabolismo ósseo foi estudado em 14 gatos sem raça definida, nove fêmeas e cinco machos, não castrados, com idade entre 1 e 3 anos. As variáveis estudadas foram tiroxina total (T4), tiroxina livre (FT4) e o telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP) mensurados por radioimunoensaio, a osteocalcina (OC) mensurada por ensaio radioimunométrico e a densidade mineral óssea (DMO) pela técnica da densitometria óptica. As concentrações séricas da OC apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si, nos quatro momentos (antes da indução, 14, 28 e 42 dias). Já o ICTP, um marcador específico da reabsorção óssea, não apresentou diferença significativa entre os momentos. Este parece ser o primeiro estudo que mensurou o ICTP sérico em gatos com hipertireoidismo. A DMO apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) aos 14 dias em relação ao momento inicial. Provavelmente o remodelamento ósseo foi provocado pelo estado hipertireóideo, visto que tanto a OC como o ICTP apresentaram excelente correlação positiva com a TT4 e um pouco inferior com a FT4. A FT4 não apresentou correlação positiva com o ICTP, excetuando-se aos 28 dias. Observou-se baixa correlação, em todos os momentos, entre os marcadores do metabolismo ósseo e a densidade mineral óssea realizada pela técnica de densitometria óptica. Conclui-se que o excesso dos hormônios tireoidianos em gatos provocou aumento do remodelamento ósseo visto que ocorreu alta correlação entre estes hormônios e os marcadores do metabolismo ósseo. Conclui-se também que a tireotoxicose não foi suficiente para elevar os níveis séricos do ICTP, sugerindo que nos estágios precoces não há predomínio da atividade osteoclástica. O hipertireoidismo provocou diminuição da DMO óssea, porém a OC e o ICTP apresentaram baixa correlação com esta variável.

Palavras-chave: hipertireoidismo, marcadores metabolismo, ósseo, gatos

Abstract

The effect of experimental hyperthyroidism (150 µg/kg/day/42 days) on markers of bone metabolism was studied in fourteen shorthair intact cats, nine females and five males, from 1 to 3 years of age. Total thyroxine (T4), free thyroxine (FT4), carboxi-terminal telopeptides of collagen type I (ICTP) (measured by radioimmunoassay), osteocalcin (OC) (measured by immunoradiometric assay) and bone mineral density (DMO) (measured by the optic densitometria) were evaluated. Serum concentrations of OC were significantly different ($p < 0.05$) between all four moments (before the induction, 14, 28 and 42 days). The DMO presented significant difference ($p < 0.05$) at the 14 days in comparison to the initial moment. Bone remodeling was probably caused by the hyperthyroid state, since both OC and ICTP presented strong positive correlation with TT4 and a little lowerth FT4. The FT4 concentrations did not present positive correlation with ICTP, except at 28 days. Correlation between markers of bone metabolism and the bone mineral density was low in all the moments. High correlation was observed between thyroid hormones and markers of bone metabolism. In conclusion, this excess of thyroid hormones in cats may cause an increase of bone remodeling. Moreover, thyrotoxicosis in this study was not enough to raise the serum levels of ICTP, suggesting no predominance of osteoblastic activity in these early stages. The experimental hyperthyroidism was also associated to the reduction of bone DMO, however OC and ICTP levels demonstrated low correlation with this variable.

Keywords: hyperthyroidism, markers metabolism bone, cats

Introdução

O hipertireoidismo é uma causa bem conhecida de alteração do metabolismo ósseo, caracterizado por aumento na atividade osteoblástica e osteoclástica com predomínio da reabsorção óssea e resultando em diminuição na massa óssea (Mosekilde et al., 1990, Garnero et al., 1994), portanto, o uso dos marcadores do metabolismo ósseo pode ser particularmente interessante nas investigações das alterações ósseas associadas com doença da tireóide.

Os marcadores bioquímicos da remodelação óssea podem ser divididos em marcadores de formação e marcadores de reabsorção óssea. Esses marcadores podem ser dosados tanto no sangue como na urina (Delmas, 1993). São métodos simples, sensíveis e acurados de reconhecimento da progressão de doenças metabólicas ósseas ou da resposta à terapia com drogas. Os marcadores do metabolismo ósseo quantificam em tempo real a atividade de formação ou reabsorção das células ósseas, enquanto a densitometria mineral e as radiografias ósseas não o fazem em tempo real (Coleman, 2002). Diferentemente de biopsias ósseas repetidas, mensurações dos marcadores ósseos séricos ou urinários não interferem no metabolismo ósseo (Allen, 2003).

Os marcadores bioquímicos da renovação (*turnover*) óssea são enzimas sintetizadas por osteoblastos e osteoclastos, ou compostos orgânicos liberados durante a síntese e reabsorção da matriz óssea (Seibel, 2000). Vários testes bioquímicos foram descritos para a mensuração da concentração sérica ou urinária dos marcadores do metabolismo ósseo em humanos (Delmas, 2001). O objetivo da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo é a correlação das concentrações séricas ou urinárias com a atividade dos osteoblastos (formação) e dos osteoclastos (reabsorção) (Allen, 2003).

Os marcadores da formação óssea são detectados somente no soro e os marcadores de reabsorção óssea podem ser detectados no soro ou na urina (Allen, 2003). Os marcadores da formação óssea são osteocalcina (OC), fosfatase alcalina total (FAT), fosfatase alcalina óssea (FAO), peptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I (PICP) e peptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I (PINP), enquanto os marcadores de reabsorção óssea são fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP ou CTX), piridinolina (U-PYD), deoxipiridinolina (U-DPD),

hidroxiprolina (U-HYP), porção aminoterminal do procolágeno I (U-NTX) e porção carboxiterminal do procolágeno I (U-CTX) (Delmas, 2001)

Existem trabalhos em humanos (Delmas et al., 1993), em bovinos (Liesegang et al., 2000, Holtenius and Ekelund, 2005), cães (Philipov et al., 1995; Allen et al., 1998,2000), eqüinos (Price et al., 1995, 2001), gatos (Delaurier et al., 2004), ovinos (Johnson et al., 1997), ratos (Chavassieux et al., 2001) e suínos (Weiler et al., 1995) correlacionando os marcadores do metabolismo ósseo com diversas doenças que provocam alterações ósseas e, também, correlacionando com a densitometria mineral óssea (Remes et al., 2004). Há também trabalhos que mensuraram os marcadores do metabolismo ósseo em gatos com hipertireoidismo (Horney et al., 1995, Archer and Taylor, 1996, Foster and Thoday, 2000).

A fosfatase alcalina óssea é um marcador específico e sensível na avaliação do metabolismo ósseo no hipertireoidismo (Garnero et al, 1994; Foster and Thoday, 2000). A osteocalcina também é um marcador específico e sensível da formação óssea, aumenta no hipertireoidismo em humanos (Lee et al., 1990) e em gatos (Archer and Taylor, 1996). A osteocalcina se correlaciona positivamente com o grau da hiperatividade da tireóide e negativamente com as alterações na densidade mineral óssea (Lee et al., 1990). Além disso, os hormônios tireoidianos estimulam diretamente os osteoblastos a secretarem osteocalcina (Rizzoli et al., 1990).

PICP e o PINP são fragmentos da lise do pró-colágeno tipo I e também representam a formação óssea na saúde ou na doença (Delmas, 1993). Esses marcadores ósseos podem ser usados como índices da formação óssea em doenças ósseas metabólicas como a osteoporose (Ebeling et al., 1992). Esses fragmentos produzidos pelos osteoblastos são os marcadores de formação óssea clinicamente mais sensíveis e específicos (Swaminathan, 2001). Comercialmente estão disponíveis kits de RIE e ELISA para mensuração sérica do PICP e do PINP em humanos, havendo reação cruzada com o soro de animais (Allen, 2003). Convém lembrar que esses marcadores procedem de diferentes fases do processo de formação óssea e, portanto, as alterações nos seus níveis podem depender de mecanismos diferentes, de acordo com a fisiopatologia de cada doença (Melkko et al., 1990).

O ICTP, marcador da reabsorção óssea, é mensurado somente no soro (Delmas et al., 2000) e possui a vantagem de não ser afetado pela depuração renal (Risteli et al., 1993). Demonstrou-se, *in vivo* e *in vitro*, uma correlação significativa entre os níveis do ICTP e a taxa de degradação da matriz óssea por meio de histomorfometria (Eriksen et al., 1993). Atualmente, dispõe-se de um teste de RIE policlonal (Risteli et al., 1993) para a determinação do ICTP no soro e na urina, respectivamente. Allen et al. (1998) observaram reação cruzada entre o kit humano e soro canino, portanto pode ser usado nesta espécie, mas não existem trabalhos publicados sobre a reação cruzada entre o soro felino e kit humano (Delaurier et al., 2004).

A determinação da densidade mineral óssea é um fator fundamental para a definição do quadro de desmineralização, servindo também para o estabelecimento de um protocolo terapêutico e o monitoramento dos pacientes acometidos, podendo desta forma prevenir a ocorrência de fraturas patológicas (Scharla et al., 1999). Diferentes técnicas densitométricas são descritas na medicina veterinária e humana, visando proporcionar precisão nos dados e boas condições de trabalho. Inúmeros relatos demonstram que a técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas é útil na avaliação da densidade mineral óssea, pois se apresenta com alta precisão, tendo o seu uso uma importância destacada (Louzada et al., 1996, Gallo et al., 1996, Vulcano et al., 1998, Rahal et al., 2002).

A densitometria mineral óssea em relação à radiografia simples, além de detectar a osteopenia, possui a vantagem de melhorar a identificação e quantificação das alterações regionais ou sistêmicas na densidade mineral óssea (Allen et al., 2000), porém poucos centros veterinários utilizam este meio diagnóstico na prática clínica. Um dos inconvenientes da densitometria óssea é a incapacidade de distinguir se a alteração na densidade mineral óssea (DMO) foi provocada por efeitos da formação ou da reabsorção óssea. Já os marcadores do metabolismo ósseo são específicos para a formação ou reabsorção óssea (Allen et al., 2003).

A diminuição da densidade mineral óssea em humanos hipertireóides é freqüente (Allain and McGregor, 1992). Em ratas com hipertireoidismo se observou osteopenia (Gouveia et al., 1997) e diminuição significativa da densidade mineral óssea (Kung and Ng, 1994). Em gatos há somente um

trabalho descrevendo a diminuição da densidade mineral óssea secundário ao hipertireoidismo (Costa, 2002), entretanto este trabalho não correlacionou com os marcadores do metabolismo ósseo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre os marcadores bioquímicos da formação e da reabsorção óssea e a densitometria mineral óssea, em gatos com hipertireoidismo experimental.

Material e Métodos

Foram utilizados 14 gatos sem raça definida, nove fêmeas e cinco machos, não castrados, com idade entre um e três anos. O estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP, Botucatu, SP.

Os animais foram mantidos em jaulas individuais de ferro esmaltado, alimentados com ração seca comercial e água à vontade. Os estudos se iniciaram após um período de 15 dias de adaptação dos gatos ao ambiente e manejo. No início deste período os animais foram vacinados, vermifugados e estavam livres de ectoparasitas.

A tireotoxicose foi induzida pela administração oral, de comprimidos, de levotiroxina sódica (150µg/kg/dia) durante 42 dias.

Os animais foram avaliados em quatro momentos (M), sendo que o M0, antes da administração da levotiroxina sódica, resultou nos valores basais dos diversos parâmetros estudados. Durante o período experimental, foram considerados outros três momentos de avaliação: aos 14 dias (M1), aos 28 dias (M2) e aos 42 dias (M3). As colheitas de sangue, para obtenção do soro foram realizadas entre 9 e 10 horas da manhã, cerca de 3 a 4 horas após a administração da levotiroxina sódica, sendo este o tempo em que ocorre o pico de concentração da tiroxina em gatos (Hays et al., 1992). Além disso, o meio da manhã é o horário preferível para a colheita de sangue para a mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo, pois este horário minimiza os efeitos da variação na secreção.

Colheita das amostras

As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular dentro de tubos contendo gel ativador de coágulo. Os tubos foram centrifugados a 2000g por 10

minutos em menos de uma hora pós-colheita. Após a separação do soro as amostras foram aliqüotadas em cinco frascos de 1,2 mL e congeladas em freezer a -70°C até o momento da realização dos testes. As amostras para dosagem do cálcio ionizado foram colhidas de sangue arterial dentro de tubos heparinizados em anaerobiose.

Mensuração da Tiroxina Total (TT4) e Tiroxina Livre (FT4)

A mensuração das concentrações séricas da TT4 e FT4 foi realizada pela técnica de RIE em fase sólida, utilizando kit comercial (Coat-Count Total T4 e Free T4, DPC, Los Angeles, USA). O teste detecta concentração de TT4 de 0 a 24 $\mu\text{g}/\text{dl}$, com sensibilidade mínima descrita é de 0,25 $\mu\text{g}/\text{dl}$ e para a FT4 de 0 a 10 ng/dl , com sensibilidade mínima descrita é de 0,15 ng/dl .

Mensuração do PINP e do ICTP

A mensuração das concentrações séricas de PINP (Procollagen PINP, Orion Diagnostica, Espoo, Finlândia) e do ICTP foram realizadas pela técnica de RIE em fase sólida, (ICTP, Orion Diagnostica, Espoo, Finlândia) foram realizadas utilizando-se kit humano comercial. O teste detecta concentração de PINP de humanos entre 0 e 250 ng/ml , com sensibilidade mínima é de 2 ng/ml . e para o ICTP o teste detecta concentração de humanos entre 0 e 50 $\mu\text{g}/\text{l}$, com sensibilidade mínima de 0,4 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Mensuração da Osteocalcina

A mensuração das concentrações séricas de osteocalcina foi realizada usando-se kit humano comercial para o teste RIMA (Osteocalcina, DSL, Texas, USA). O teste detecta concentração de osteocalcina de humanos entre 0-60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, com sensibilidade mínima descrita é de 0,3 ng/ml .

Os protocolos recomendados pelos fabricantes para a realização das mensurações da TT4, FT4, ICTP e OC não foram alterados. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata e as concentrações foram calculadas pela média da mensuração das amostras em duplicata. As amostras em duplicata com coeficiente de variação maior que 15% foram excluídas da análise deste estudo.

Coeficiente de Variação

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da mensuração em duplicata das amostras foram usados para a determinação da

precisão intra-ensaio dos hormônios e dos marcadores do metabolismo ósseo séricos. Para a determinação da precisão foram feitos "pool" (n=16) de cada momento. Cada "pool" foi testado seis vezes dentro do mesmo teste. A média, o desvio padrão e o CV foram determinados para cada "pool" e a média do CV dos momentos foi definido como a precisão inter-ensaio dos hormônios e dos marcadores do metabolismo ósseo séricos.

Densitometria Mineral Óssea

A avaliação da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio direito foi realizada pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas, conforme descrito na literatura (Rahal et al., 2002), nos quatro momentos. Para melhor análise seqüencial dos valores densitométricos, padronizou-se a seleção da região da metáfise localizada 5 mm acima da cicatriz epifisária. Para cada momento e animal se fez três radiografias, realizaram-se três leituras densitométricas em cada radiografia, totalizando nove valores de densidade mineral óssea. O valor densitométrico final, para cada animal nos diferentes momentos, foi obtido por meio do cálculo da média dos nove valores.

Análise Estatística

A análise estatística das variáveis ao longo dos diferentes momentos foi realizada considerando-se a técnica de análise de variância para medidas repetidas, teste de Fisher e teste de Tukey. Para a interpretação das letras, deve-se considerar que duas médias seguidas pelo menos de uma mesma letra não diferem ao nível de 5% de significância. Para o estudo da correlação entre as variáveis em cada um dos momentos, utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson.

Resultados

Os resultados das concentrações séricas dos hormônios tireoidianos e dos marcadores do metabolismo ósseo e os valores da DMO estão descritos na Tabela 1.

Os kits de TT4, FT4, ICTP e OC conservaram a capacidade de detecção nas amostras felinas e todos os valores estavam dentro da margem de detecção dos kits, sem a necessidade de diluição das amostras.

Concentração sérica de TT4: Houve uma clara tendência de aumento das concentrações séricas de TT4 a partir de M0 (Tabela1). Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) na concentração de TT4 entre o M0 e os demais momentos e entre M1 e M3. Não houve diferença significativa entre M1 e M2 e entre M2 e M3.

Concentração sérica de FT4: Houve um aumento marcante das concentrações séricas de FT4 a partir de M0 (Tabela1). Observou-se diferença significativa entre todos os momentos.

Concentração sérica de OC: Observou-se aumento contínuo das concentrações da OC de M0 a M3, com diferença significativa entre todos os momentos.

Concentração sérica de ICTP: Detectou-se uma variação entre os indivíduos bastante ampla nos quatro momentos. Não foi observada diferença estatística entre os quatro momentos do estudo.

Densidade mineral óssea: Foi caracterizada uma queda, estatisticamente significativa, da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio dos animais submetidos ao protocolo experimental de indução à tireotoxicose de M1 em relação à M0. Nos demais momentos ocorreram um gradual decréscimo dos valores médios da densidade mineral óssea.

Correlação entre as variáveis estudadas:

As correlações entre as diversas variáveis estudadas estão dispostas na Tabela 2. Em M0 variáveis não apresentaram boa correlação entre si.

A TT4 apresentou boa correlação positiva em todos os momentos com os marcadores do metabolismo ósseo estudados, enquanto que a FT4 só apresentou correlação significativa com a OC aos 28 dias.

Enquanto que a OC e o ICTP somente apresentaram correlação negativa com o cálcio iônico em M1. Não se observou correlação positiva entre a OC e o ICTP somente em M0.

Coeficiente de Variação

O coeficiente de variação (CV) da TT4, FT4, OC e ICTP estão descritos na Tabela 3. O CV das amostras medidas em duplicatas foi usado para a determinação da precisão intra-ensaio. A média do CV do "pool" dos quatro momentos foi definida como a precisão inter-ensaio para todas as variáveis.

Discussão

Os hormônios tireoidianos possuem um papel importante no remodelamento ósseo (Mosekilde et al., 1990). No hipertireoidismo estes hormônios aumentam a ativação de novos ciclos de remodelamento e estimulam a atividade dos osteoblastos e osteoclastos que são observados por alterações bioquímicas, densitométricas e histológicas (Allain and McGregor, 1992, Mosekilde et al., 1990). A mensuração dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo é uma forma de avaliar esta atividade (Deulaurier et al., 2004, Allen et al., 2003) e outra é a densitometria mineral óssea (Costa, 2002).

Neste estudo foi observado aumento significativo da OC a partir do desenvolvimento do hipertireoidismo, ou seja, de M0 com relação aos demais momentos. O mesmo já havia sido descrito em gatos com hipertireoidismo espontâneo (Archer and Taylor, 1996). Estes mesmo autores verificaram que a OC variou de 0 a 1,7 ng/mL valores bem superiores aos obtidos nesta pesquisa. Valores altos obtidos em animais com hipertireoidismo espontâneo podem refletir a cronicidade do processo. O aumento da osteocalcina ao longo da tireotoxicose sugere que esta condição promove remodelamento ósseo, pois se sabe que a osteocalcina é uma proteína sintetizada pelo osso, sendo considerada um marcador específico da atividade dos osteoblastos e do remodelamento ósseo (Thiede et al., 1994).

Até o momento deste estudo os autores desconheciam trabalhos que mensuraram o ICTP sérico em gatos com hipertireoidismo. Não houve diferença significativa entre os momentos nos animais submetidos à tireotoxicose. Estes resultados diferem dos descritos em humanos, onde ocorre aumento tanto dos marcadores da formação como da reabsorção óssea (Garnero et al., 1994, Jódar et al., 1997) e diminuição da massa óssea (Raiz, 1999). Aparentemente o período experimental não foi suficiente para fazer com que os efeitos da reabsorção fossem superiores ao da formação, mesmo tendo havido diminuição da DMO, sugerindo que nos estágios precoces não há predomínio da atividade osteoclástica. Era esperado, segundo Garnero et al. (1994), que houvesse um aumento marcante do ICTP, pois este marcador reflete a atividade dos osteoclastos e o excesso dos hormônios tireoidianos exerce um efeito direto maior sobre a reabsorção óssea, embora existam trabalhos que não descrevem o predomínio da atividade osteoclástica e,

portanto, dos marcadores de reabsorção óssea (Diamond et al., 1991, Marcocci et al., 1994).

No hipertireoidismo as atividades osteoblásticas e osteoclásticas estão aumentadas, com predomínio da reabsorção óssea visto através do aumento dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo (Garnero et al., 1994) e da diminuição da massa óssea, determinada pela densitometria mineral óssea, técnica rápida, acurada e reproduzível para avaliar a DMO (Costa, 2002, Vulcano et al., 1998). Os resultados deste estudo diferem, pois não foi observado aumento significativo do ICTP, mas sim da OC. A razão pela qual se obteve estes resultados necessita de outros estudos e mais prolongados.

Neste estudo houve uma diminuição significativa na DMO em M1 em comparação com M0 e um decréscimo gradual dos valores médios da densidade mineral óssea nos demais momentos. Só existe uma descrição da diminuição da DMO em gatos com hipertireoidismo (Costa, 2002), achados semelhantes foram obtidos neste estudo. A redução significativa da DMO também foi descrita em humanos com hipertireoidismo (Allain and McGregor, 1992, Diamond et al., 1994, Jódar et al., 1997, Kumeda et al., 2000), indicando perda da massa óssea (Raisz, 1999). Isto também foi descrito em ratos submetidos a um curto período de tireotoxicose (Kung and Ng, 1994).

Provavelmente o remodelamento ósseo foi provocado pelo estado hipertireóideo, visto que tanto a OC como o ICTP apresentou excelente correlação positiva com a TT4 e um pouco inferior com a FT4. A FT4 não apresentou correlação positiva com o ICTP, excetuando-se em M2. Não foi observada correlação entre T4 e OC em um estudo realizado com 36 gatos com hipertireoidismo (Archer and Taylor, 1996), porém a correlação entre os marcadores do metabolismo ósseo e os hormônios tireoidianos foram descritos em humanos hipertireóideos (Jódar et al., 1997). Isto ocorre principalmente com o ICTP, que já foi sugerido como bom marcador indireto da avaliação do *status* da glândula tireóide. No presente estudo a correlação da ICTP com a TT4 foi excelente, porém um pouco inferior à apresentada pela OC.

Normalmente a osteocalcina em humanos com hipertireoidismo se correlaciona positivamente com o grau da hiperatividade da tireóide e negativamente com as alterações na densidade mineral óssea (Lee et al., 1990). A correlação com os hormônios ocorreu, entretanto a correlação

negativa com a DMO não ocorreu em todos os momentos. Provavelmente este achado reflita a cronicidade dos efeitos da tireotoxicose.

Observou-se baixa correlação entre os marcadores do metabolismo ósseo e a densidade mineral óssea realizada pela técnica de densitometria óptica. Resultado semelhante foi descrito em pacientes recebendo doses supressivas de levotiroxina, ou seja, dose capaz de provocar hipertireoidismo subclínico (Marcocci et al., 1994). É importante salientar que a densitometria mineral óssea é uma técnica padrão-ouro de avaliação da atividade das células ósseas (Delaurier et al., 2004), porém reflete somente uma fotografia do balanço ósseo em algum momento específico, enquanto que os marcadores do metabolismo ósseo refletem a atividade de formação e reabsorção em tempo real (Allen et al., 2000, Allen, 2003). Estes resultados sugerem que as mensurações da OC e do ICTP devem ser utilizadas com cautela no acompanhamento do hipertireoidismo felino, por terem apresentado baixa correlação com a DMO.

Como existem semelhanças nas alterações do tecido ósseo na tireotoxicose de origem exógena e endógena em humanos, conforme descrito em mulheres submetidas a uma reposição hormonal excessiva (Kung and Ng, 1994), acredita-se que o mesmo possa ocorrer em gatos. Possivelmente a perda de massa óssea, observada neste estudo, também ocorrerá de forma semelhante no hipertireoidismo felino de origem endógena. Em humanos o hipertireoidismo é mais um fator de risco de osteoporose (Jódar et al., 1997), visto que os hormônios tireoidianos proporcionam uma maior fragilidade do osso e com isso aumenta o risco de fraturas patológicas decorrentes da osteoporose (Jódar et al., 1997, Scharla et al, 1999). Nos gatos utilizados nesta pesquisa, esse fator agravante não ocorreu durante o período experimental. Isto também pode ter decorrido em virtude do curto tempo de hipertireoidismo nos gatos estudados, já que o período de remodelamento ósseo em paciente humano sadio requer mais de seis meses (Marcocci et al., 1994) e é provável que o mesmo ocorra em felinos. Porém, para confirmação desta hipótese há necessidade de estudos histomorfométricos.

Conclusões

Conclui-se que o excesso dos hormônios tireoidianos em gatos provocou aumento do remodelamento ósseo visto que ocorreu alta correlação entre estes hormônios e os marcadores do metabolismo ósseo. Conclui-se também que a tireotoxicose não foi suficiente para elevar os níveis séricos do ICTP, sugerindo que nos estágios precoces não há predomínio da atividade osteoclástica. O hipertireoidismo provocou diminuição da DMO óssea, porém a OC e o ICTP apresentaram baixa correlação com esta variável, indicando que o uso isolado dos marcadores do metabolismo ósseo deve ser feito com cautela na avaliação da perda de massa óssea em gatos com hipertireoidismo.

Referências Bibliográficas

- ALLAIN, T. J., MCGREGOR, A. M, 1992: Thyroid hormones and bone. *J. Endocrinol.* **139**, 9-18.
- ALLEN, L.C., ALLEN, M.J., BREUR, G.J, 2000: HOFFAMANN, W.E., RICHARDSON, D.C. A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. *Research Vet. Sc.*, **68**, p.231-235.
- ALLEN, M.J, 2003: Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet. Clinical Pathol.*, **32**, p.101-113.
- ALLEN, M.J., HOFFAMANN, W.E., BREUR, G.J., RICHARDSON, D.C, 1998: Serum markers of bone metabolism in dogs. *Research Vet. Sc.*, **59**, p.250-254.
- ARCHER, J.T., TAYLOR, S.M, 1996: Alkaline phosphatase bone isoenzyme and osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. *Can. Vet. Journal*, **37**, p.735-739.
- CARDOSO, M.J.L. 2002: Avaliação dos efeitos cardíacos, radiográficos, eletrocardiográficos, do hemograma e nos níveis séricos de uréia, creatinina, sódio, potássio e enzimas hepáticas, em gatos com hipertireoidismo experimental. Botucatu: UNESP, p.174, Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- CHAVASSIEUX, P., GARNERO, P., DUBOEUF, F., VERGNAUD, P., BRUNNER-FERBER, F., DELMAS, P.D., MEUNIER, P.J, 2001: Effects of a new selective estrogen receptor modulator (Mdl 103,323) on cancellous and

cortical bone in ovariectomized ewes: a biochemical, histomorphometric, and densitometric study. *J. Bone Min. Research*, **16**, 89-96.

CHRISTGAU, S., ROSENQUIST, C., ALEXANDERSON, P., BJARNASON, N.H., RAVN, P., FLEDELIUS, C., HERLING, C., QVIST, P., CHRISTIANSEN, C, 1998: Clinical evaluation of the Serum CroosLaps One Step Elisa, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clinical Chemistry*, **44**, 2290-2300, 1998.

COLEMAN, R.E, 2002: The clinical use of bone resorption markers in patients with malignant bone disease. *Cancer*, **94**, 2521-2533.

COSTA, F.S, 2002: Tirotoxicose experimental em gatos: Efeitos sobre o tecido ósseo, níveis séricos de fosfatase alcalina e metabolismo de cálcio e fósforo. Botucatu. 101p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista de Botucatu - SP.

DELAURIER, A., JACKSON, B., PFEIFER, D., INGHAM, K., HORTON, M.A., PRICE, J.S, 2004: A comparison of methods for measuring serum and urinary markers of bone metabolism in cats. *Research Vet. Science*, **77**, 29-39.

DELMAS, P.D, 2001: Bone marker nomenclature. *Bone*, **28**, 575.

DELMAS, P.D., GINEYTS, E., BERTHOLIN, A., GARNERO, P., MARCHAND, F, 1993: Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget's disease. *J. Bone Min. Research*, **8**, 643-648.

DIAMOND, T., NERY L., HALES, I, 1991: A therapeutic dilemma: suppressive doses of thyroxine significantly reduce bone mineral measurements in both premenopausal and postmenopausal women with thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **72**, 184s.

EBELING, P.R., PETERSON, J.M., RIGGS, B.L, 1992: Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J. Bone Miner Res*, **7**, 1243-1250.

ERIKSEN, E.F., CHARLES, P., MELSEN, F, 1993: Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation to bone histomorphometry. *J Bone Miner Res*, **8**, 127-32.

FOSTER, D.J., THODAY, K.L, 2000: Tissue sources of serum alkaline phosphatase in 34 hyperthyroid cats: a qualitative and quantitative study. *Research Veterinary Science*, **68**, 89-94.

- GALLO, R. N., RAHAL, S. C., VULCANO, L. C., LOUZADA, M. J. KQ, 1996: Avaliação da densidade óssea em gatos em crescimento submetidos a dois tipos de ração. In: XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, 1996, Campo Grande. Anais... Campo Grande, MS.
- GARNERO, P., VASSY, V., BERTHOLIN, A., RIOU, J.P., DELMAS, P.D, 1994: Markers of bone turnover in hyperthyroidism and the effects of treatment. *J. Clinical Endocrinol. Metab.*, **78**, 955-959.
- GOUVEIA, C. H. A., JORGETTI, V., BIANCO, A.C, 1997: Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J. Bone Miner. Res.*, **12**, 2098-2107.
- HANSON, D.A., WEIS, M.A.E., BOLLEN, A.M, 1992: A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptide in urine. *J Bone Miner Res*, **7**, 1251-1258.
- HAYS, M.T.; HSU, L.; KOHATSU, S, 1992: Transport of the thyroid hormones across the feline gut wall. *Thyroid*, **2**, 45.
- HOLTENIUS, K., EKELUND, A. Biochemical markers of bone turnover in the dairy cow during lactation and dry period. *Research Veterinary Science*, **78**, 17-19.
- JÓDAR, E., MUÑOZ-TORRES, M., ESCOBAR-JIMÉNEZ, F., QUESADA, M., LUNA, J.D., OLEA, N, 1997: Antiresorptive therapy in hyperthyroid patients: longitudinal changes in bone and mineral metabolism. *J. Clinical Endocrinol. Metabol*, **82**, 1989-1994.
- JOHNSON, R.B., GILBERT, J.A., COOPER, R.C., DAÍ, X., NEWTON, B.I., TRACY, R.R., WEST, W.F., DEMOSS, T.L., MYERS, P.J., STRECKFUS, C.F, 1997: Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. *J. Periodontology*, **68**, 864-871.
- KUNG, A. W., NG, F. A rat model of thyroid hormone-induced bone loss: effect of antiresorptive agents on regional bone density and osteocalcin gene expression. *Thyroid*, v.4, n.1, p.93-8, 1994.
- KUMEDA, Y., INABA, M., TAHARA, H. KURIOKA, Y., ISHIKAWA, T., MORII, H., NISHIZAWA, Y, 2000: *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85**, 4157-4161,.

- LEE, M.S., KIM, S.Y., LEE, M.C, 1990: Negative correlation between the change in bone mineral density and serum osteocalcin in patients with hyperthyroidism. *J. Clinical Endocrinol. Metab.*, **70**, 766-770.
- LIESEGANG, A., EICHER, R., SASSI, M.L., RISTELI, J., KRAENZLIN, M., RIOND, J.L., WANNER, M, 2000: Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. *J. Dairy Sc.*, **83**, 1773-1781.
- LOUZADA, M. J. Q., BELANGERO, W. D., PELÁ, C. A., SANTOS - PINTO, R, 1996: Avaliações da densidade óssea em radiografias – I metodologia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA, 30, Curitiba. **Anais**.
- MARCOCCI, C., GOLIA, F., BRUNO-BOSSIO, G., VIGNALI, E., PINCHERA, A, 1994: Carefully monitored levothyroxine suppressive therapy is not associated with bone loss in premenopausal women. *J. Clinical Endocrinol. Metabol.*, **78**, 818-823.
- MELKKO J, NIEMI S, RISTELI L, RISTELI J, 1990: Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem.*, **36**, 1328-1332.
- MOSEKILDE, L., ERIKSEN, E. F., CHARLES, P, 1990: Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol. Metabol. Clinics North America*, **19**, 35-63.
- PHILIPPOV, J.P., PASCALEV, M.D., AMINKOV, B.Y., GROSEV, C.D, 1995: Changes in serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen in an experimental model of canine osteomyelitis. *Calcified Tissue Int.*, **57**, 152-154.
- PRICE, J.S., JACKSON, B., EASTELL, R., GOODSHIP, A.E., BLUMSOHN, A., WRIGHT, I., STONEHAM, S., LANYON, L.E., RUSSEL, R.G, 1995: Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Equine Vet. J.*, **27**, 201-207.
- PRICE, J.S., JACKSON, B., GRAY, J.A., HARRIS, P.A., WRIGHT, I., PFEIFFER, D.U., ROBINS, S.P., EASTELL, R., RICKETTS, S.W, 2001: Biochemical markers of bone metabolism in growing throughbreds: a longitudinal study. *Research Vet. Sc.*, **71**, 37-44.
- RAHAL, S. C., MORTARI, A. C., CAPORALI, E. H. G., VULCANO, L. C., SANTOS, F. A. M., TAKARIRA, R. K., CROCCI, A.J, 2002: Densitometria

óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. *Ciência Rural*, **32**, 421-425.

RAISZ, L.G, 1999: Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*, **45**, 1353-1358.

REMES, T., VÄISÄNEN, S.B., MAHONEN, A., HUUSKONEN, J., KRÖGER, H., JURVELIN, J.S., PENTILÄ, I.M., RAURAMAA, R, 2004: The association of bone metabolism with bone mineral density, serum sex hormone concentrations, and regular exercise in middle-aged men. *Bone*, **34**, 439-447.

RISTELI, J., ELOMA, S., TRIVEDI, P., MÄNTAUSTA, O., ROWE, D.W, 1993, Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone resorption. *Clin Chem*, **39**, 635-640.

RIZZOLI, R., POSER, J., BARGI, U, 1986: Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. *Metabolism*, **35**, 71-74.

SCHARLA, S. H., WOLF, S., DÜLL, R., LEMPERT, U. G, 1999: Prevalence of low bone mass and endocrine disorders in hip fracture patients in Southern Germany. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **107**, 547-54.

SEIBEL, M.J, 2000: Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporosis Internacional*, **11**, 18-29.

SWAMINATHAN, R, 2001: Biochemical markers of bone turnover. *Clin. Chim. Acta.*, **313**, 95-105.

THIEDE, M.A., SMOCK, S.L., PETERSEN, D.N., GRASSER, W.A., THOMPSON, D.D., NISHIMOTO, S.K, 1994: Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megacariócitos and peripheral blood platelets. *Endocrinol.*, **135**, 929-937.

VULCANO, L.C.; LEAL, A.C.R.; LOUZADA, M.J.Q.; MUNIZ, L.M.R.; MAMPRIM, M.J, 1998: Determination of the normal values of density of the radius in Rottweilers, using radiographic optical densitometry (experimental study). In: **XXIII Congresso Mundial de Medicina Veterinária de Pequenos Animais**, Buenos Aires, Argentina.

WEILER, H.A., WANG, Z., ATKINSON, S.A, 1995: Dexamethasone treatment impairs calcium regulation and reduces bone mineralization in infant pigs. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**, 805-811.

Tabela 1: Valores séricos dos hormônios tireoidianos e dos marcadores do metabolismo ósseo e densidade mineral óssea em 14 gatos normais (M0) e após a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3). Valores são expressos como média \pm desvio padrão (intervalo).

	0 (M0)	14 dias (M1)	28 dias (M2)	42 dias (M3)
TT4 ($\mu\text{g/dL}$)	2,28 \pm 0,88 ^a (1,15-2,78)	8,12 \pm 4,27 ^b (1,14-14,64)	11,02 \pm 4,70 ^{bc} (1,76-18,78)	11,72 \pm 4,26 ^c (5,5-22,16)
FT4 (ng/dL)	1,38 \pm 0,25 ^a (1,05-1,89)	3,38 \pm 0,81 ^b (2,35-4,74)	6,93 \pm 1,28 ^c (5,18-9,36)	8,98 \pm 0,57 ^d (8,23-9,91)
DMO (mmAl)	1,40 \pm 0,23 ^a (1,03-1,68)	1,34 \pm 0,20 ^b (0,92-1,59)	1,31 \pm 0,20 ^b (0,90-1,51)	1,30 \pm 0,18 ^b (0,90-1,50)
OC (ng/mL)	0,15 \pm 0,03 ^a (0,12-0,19)	0,22 \pm 0,05 ^b (0,15-0,31)	0,34 \pm 0,06 ^c (0,25-0,42)	0,42 \pm 0,07 ^d (0,32-0,57)
ICTP (ng/mL)	8,59 \pm 5,78 ^a (1,51-9,92)	8,56 \pm 3,70 ^a (3,03-14,62)	7,17 \pm 3,44 ^a (4,83-14,68)	11,94 \pm 3,48 ^a (8,21-23,01)

Valores seguidos de mesmas letras nas linhas não diferem ($P > 0,05$)

Tabela 2: Correlação entre os hormônios tireoidianos, marcadores do metabolismo ósseo e a densidade mineral óssea em 14 gatos normais (M0) e após a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3).

		TT4	FT4	DMO	OC	ICTP
TT4	0	-	0,10	-0,30	-0,08	0,23
	14 dias	-	0,47	-0,28	0,91*	0,59*
	28 dias	-	0,51*	0,09	0,86*	0,87*
	42 dias	-	0,18	0,14	0,85*	0,93*
FT4	0	-	-	-0,33	0,04	0,29
	14 dias	-	-	0,05	0,33	0,27
	28 dias	-	-	0,25	0,57*	-0,01
	42 dias	-	-	0,15	0,45	0,22
DMO	0	-	-	-	-0,15	-0,06
	14 dias	-	-	-	-0,25	-0,47
	28 dias	-	-	-	0,21	0,15
	42 dias	-	-	-	0,14	0,25
OC	0	-	-	-	-	-0,21
	14 dias	-	-	-	-	0,53*
	28 dias	-	-	-	-	0,60*
	42 dias	-	-	-	-	0,84*

*Presença de correlação estatisticamente significativa

Tabela 3: Precisão intra-ensaio e inter-ensaio das mensurações realizadas por RIMA e RIE 14 gatos normais (M0) e após a indução da tireotoxicose (M1, M2 e M3).

Precisão intra-ensaio	
TT4	5,72
FT4	4,18
OC	8,13
ICTP	4,96
Precisão inter ensaio da TT4	
M0	8,87
M1	6,47
M2	6,17
M3	7,05
Precisão inter ensaio da FT4	
M0	6,47
M1	3,70
M2	1,60
M3	1,58
Precisão inter ensaio da OC	
M0	10,99
M1	5,56
M2	4,24
M3	3,11
Precisão inter ensaio da ICTP	
M0	3,65
M1	2,44
M2	3,21
M3	2,19

Discussão Geral

Discussão Geral

Embora haja descrições da mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo em gatos (DELAURIER et al., 2004; ARCHER & TAYLOR, 1996), é primeira vez que se correlaciona marcadores do metabolismo ósseo com a densitometria mineral óssea nestes animais. Além de apresentar os valores séricos da osteocalcina em gatos adultos jovens normais, foi buscado identificar se os kits comerciais para testes do ICTP e PINP humanos podem ser usados em gatos.

Os resultados da OC sérica são semelhantes aos descritos por Archer & Taylor (1996), apesar do número de animais terem sido menor e a variação maior (0-0,25 ng/mL). Também é importante salientar que a idade dos animais variou de três a 18 anos, enquanto em neste estudo a idade dos gatos variou de um a três anos. Em cães com idade entre um e dois anos e entre três e sete anos encontrou-se concentração sérica de osteocalcina de 13, 62 ng/mL e 4,9 ng/mL, respectivamente (ALLEN et al., 1998), estes valores são muito superiores aos descritos em gatos. Uma das razões para este fato provavelmente seja decorrente do fim do crescimento do esqueleto, que em gatos ocorre em torno dos nove meses de idade, visto que esta é a idade em que ocorre o fechamento completo das placas de crescimento (DELAURIER et al., 2004).

A reação cruzada inter espécies é um ponto crítico da mensuração dos produtos da degradação do colágeno. Já foi descrita reação cruzada entre o soro de eqüinos e testes para PICP e ICTP de humanos (PRICE et al., 1995) e entre soro canino e teste de ICTP humano (ALLEN et al., 1998; PHILIPPOV et al., 1995). Os resultados deste estudo confirmam que o kit de ICTP humano pode ser usado para a mensuração sérica do ICTP em gatos. Já havia sido descrito reação cruzada entre o soro e a urina e os kits para a mensuração dos marcadores do metabolismo ósseo na urina e no soro de humanos (DELAURIER et al., 2004).

Até a realização deste estudo não haviam dados descrevendo os valores do ICTP sérico em gatos mensurados por radioimunoensaio. Já foi descrito a mensuração do ICTP sérico utilizando outros métodos como ELISA (DELAURIER, 2004), portanto, a comparação entre os resultados não foi possível, visto ter sido utilizada metodologia diferente. Os gatos estudados

apresentaram concentração sérica de ICTP semelhante aos cães com idades semelhantes (BREUER et al., 2004; ALLEN et al., 1998). Em cães com idade entre um e dois anos o valor médio descrito foi de 8,7 ng/mL (3,8 a 13,6 ng/mL) e para cães com idade entre três e sete anos foi de 7,2 ng/mL (1,0 a 13,3 ng/mL) (ALLEN et al., 1998). Em cães da raça pomerânea com idade entre um e sete anos (média 3,9 anos) a concentração média do ICTP sérico foi 7,78 ng/mL (2,9 a 18,2 ng/mL) (BREUER et al., 2004).

Diferentemente do descrito em cães (ALLEN et al., 1998) foi observada baixa correlação negativa entre a OC e o ICTP. Era esperado que houvesse correlação entre os marcadores de formação e reabsorção óssea, pois isto já foi demonstrado em gatos (DELAURIER et al., 2004), em cães (ALLEN et al., 2000) e em eqüinos (PRICE et al., 1995), entretanto é importante salientar que nenhum estudo em gatos correlacionou a OC com ICTP e, portanto o comportamento destes marcadores nos felinos pode ser diferente.

Também não foi observada boa correlação entre a DMO e os marcadores da formação e reabsorção. Provavelmente isto decorre do equilíbrio que existe entre a formação e a reabsorção óssea em animais adultos por ação combinada dos osteoblastos e osteoclastos (FROST, 1992), porém se houvesse um predomínio no processo de formação era esperado que houvesse correlação entre a OC e a DMO, pois, em geral se observa correlação entre os níveis séricos da OC e a formação óssea mensurados pela histomorfometria (EASTELL et al., 1988) e entre os níveis séricos do ICTP e reabsorção óssea, o que também pode ser comprovado pelo histomorfometria de biopsia óssea ((ERIKSEN et al., 1993). A razão da baixa correlação entre a OC e o ICTP e entre eles e a densitometria mineral óssea não pode ser esclarecida neste estudo. Um fator que pode ter contribuído é o pequeno número de animais do estudo. Além disso, os marcadores do metabolismo ósseo possuem uma grande variabilidade biológica decorrente da idade, sexo, raça, dieta, exercício e alterações circadianas (WATTS, 1999). Em humanos suspeita-se que a correlação entre a osteocalcina e a densidade mineral óssea aumenta com a idade (REMES et al., 2004). Fato semelhante também pode ocorrer em gatos, para a comprovação desta hipótese são necessários mais estudos em gatos de todas as idades.

Até o momento os autores desconhecem estudos realizados em gatos com hipertireoidismo que correlacionaram as alterações na homeostase do cálcio com a densitometria mineral óssea. No presente trabalho, os gatos com hipertireoidismo tiveram alteração significativa na homeostase do cálcio. As variáveis que tiveram alteração foram o cálcio ionizado e o PTH. Os animais tiveram aumento significativo nas concentrações séricas de PTH em M1 em relação a M0 e contínuo aumento até M3, porém sem diferença estatística. É importante salientar os valores do PTH sérico na maioria dos gatos permaneceram dentro dos valores de referência (2,9-26,3 pg/mL) (Barber et al., 1993; Barber & Elliott, 1996), somente um gato apresentou valor do PTH intacto (28,18 pg/mL) acima dos valores de referência em M2 (28 dias). Estes achados sugerem que o hipertireoidismo pode provocar aumento nas concentrações do PTH sérico. Barber & Elliott (1996) encontraram aumento do PTH em 77% dos gatos com hipertireoidismo espontâneo, enquanto nesta pesquisa somente um gato apresentou concentração do PTH acima dos valores de referência.

O PTH somente mostrou correlação positiva com a TT4 em M1, enquanto a FT4 não apresentou em nenhum momento. A correlação ocorreu no mesmo momento em que o PTH apresentou aumento significativo nas concentrações em relação ao M0, sugerindo que houve influência dos hormônios tireoidianos nas concentrações de PTH. A falta de correlação entre os hormônios tireoidianos e o PTH em todos os momentos já era esperada, tendo em vista que os hormônios tireoidianos demonstram variações periódicas na suas secreções e, conseqüentemente, as concentrações oscilantes (BROOME et al., 1988). A realização das colheitas sempre no mesmo horário tentou minimizar um pouco este efeito.

Os valores do cálcio total não apresentaram variação significativa entre os momentos, provavelmente por não refletirem o *status* do cálcio sérico (BARBER, 2004). Já o cálcio ionizado apresentou redução significativa entre os momentos estudados, mas os valores permaneceram dentro do limite normal para a espécie (1,19 a 1,33 nmol/L). Esta redução do cálcio ionizado é semelhante à obtida em outro estudo (BARBER & ELLIOTT, 1996), entretanto estes resultados diferem da hipercalemia que acompanha o hipertireoidismo em humanos (IGBAL et al., 2003; MOHAN et al., 2004). A hipercalemia

observada no hipertireoidismo humano é primariamente consequência dos efeitos dos hormônios tireoidianos na reabsorção óssea (IGBAL et al., 2003).

A redução do cálcio ionizado também já foi descrita, no entanto a causa da hipocalcemia não foi comprovada (BARBER & ELLIOTT, 1996). A presença de correlação inversa entre o cálcio ionizado e o fosfato a partir de M1 sugere que o fósforo liberado da reabsorção óssea foi suficiente para causar hipocalcemia sem causar hiperfosfatemia. Os animais apresentaram correlação negativa com o PTH de M1 a M3, sugerindo que queda significativa do cálcio ionizado a partir de M1 contribuiu para o aumento na secreção do PTH, já que a diminuição do cálcio ionizado é o principal estimulante da secreção do PTH com o objetivo de manter a homeostase do cálcio (BARBER, 2004).

Ocorreu uma diminuição significativa na DMO em M1 em comparação com M0 e um decréscimo gradual dos valores médios da densidade mineral óssea nos demais momentos. A diminuição da DMO ou a osteopenia é freqüente em humanos com hipertireoidismo, mas foi pouco relatada em animais (COSTA, 2002; GOUVEIA et al., 1997; KUNG & NG, 1994; ADAMS & JOWSEY, 1966). Um curto período de tireotoxicose exógena provocou redução significativa da densidade mineral óssea em ratos, observada após avaliação densitométrica (KUNG & NG, 1994), achados semelhantes foram obtidos neste trabalho.

Não foi observada boa correlação entre a densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio e os níveis plasmáticos de TT4 e FT4 em todos os momentos. As baixas correlações dos hormônios tireoidianos com a DMO sugerem que os efeitos da TT4 e FT4 sobre a reabsorção óssea foram inferiores ao exercido pelo PTH. Sabe-se, entretanto, que os hormônios tireoidianos possuem efeitos poderosos nos ossos, favorecendo a reabsorção óssea e conseqüentemente osteopenia (FRASER et al., 1971; MOSEKILDE et al., 1990).

Esperava-se que houvesse correlação negativa entre o cálcio ionizado e a DMO, sugerindo a perda de massa óssea, mas isto não ocorreu. A correlação negativa entre a DMO e as concentrações séricas de PTH em M2 e M3 sugerem que o PTH contribuiu para a diminuição da DMO. Mesmo com as concentrações séricas do PTH permanecendo dentro dos valores de referência é provável que os efeitos de reabsorção óssea tenham predominado.

Os resultados obtidos sugerem que gatos adultos jovens com hipertireoidismo, sem a presença de doenças concomitantes, não apresentam hiperparatireoidismo secundário, diferindo de resultados anteriormente citados (BARBER & ELLIOTT, 1996). Um fator importante a salientar é o fato de a doença espontânea ocorrer em gatos velhos na mesma faixa etária em que há maior ocorrência da insuficiência renal.

O aumento nas concentrações do PTH provavelmente seja uma conseqüência da cronicidade do hipertireoidismo (BARBER & ELLIOTT, 1996), portanto os resultados desta pesquisa provavelmente ocorreram devido ao reduzido período experimental.

Neste estudo foi observado aumento significativo da OC a partir do desenvolvimento do hipertireoidismo, ou seja, de MO com relação aos demais momentos. O mesmo já havia sido descrito em gatos com hipertireoidismo espontâneo (ARCHER & TAYLOR, 1996), porém os valores eram superiores variando de 0 a 1,7 ng/mL. Valores altos obtidos em animais com hipertireoidismo espontâneo podem refletir a cronicidade do processo. O aumento da osteocalcina ao longo da tireotoxicose sugere que esta condição promove remodelamento ósseo, pois sabe-se que a osteocalcina é uma proteína sintetizada pelo osso, sendo considerada um marcador específico da atividade dos osteoblastos e do remodelamento ósseo (THIEDE et al, 1994), correlacionando-se positivamente com o grau da hiperatividade da tireóide e negativamente com as alterações na densidade mineral óssea (LEE et al., 1990).

Até o momento deste estudo os autores desconheciam trabalhos que mensuraram o ICTP sérico em gatos com hipertireoidismo. Não houve diferença significativa entre os momentos nos animais submetidos à tireotoxicose. Estes resultados diferem dos descritos em humanos, onde ocorre aumento tanto dos marcadores da formação como da reabsorção óssea (JÓDAR et al., 1997; GARNERO et al., 1994) e diminuição da massa óssea (RAIZ, 1999). Aparentemente o período experimental não foi suficiente para fazer com que os efeitos da reabsorção fossem superiores ao da formação, mesmo tendo havido diminuição da DMO, sugerindo que nos estágios precoces não há predomínio da atividade osteoclástica. Era esperado que houvesse um aumento marcante do ICTP, pois este marcador reflete a

atividade dos osteoclastos e o excesso dos hormônios tireoidianos exerce um efeito direto maior sobre a reabsorção óssea (GARNERO et al., 1994).

Neste estudo houve uma diminuição significativa na DMO em M1 em comparação com M0 e um decréscimo gradual dos valores médios da densidade mineral óssea nos demais momentos. Só existe uma descrição da diminuição da DMO em gatos com hipertireoidismo (COSTA, 2002), achados semelhantes aos obtidos neste estudo. A redução significativa da DMO também foi descrita em humanos com hipertireoidismo (KUMEDA et al., 2000; JÓDAR et al., 1997; DIAMON et al., 1994; ALLAIN & MCGREGOR, 1992), indicando perda da massa óssea (RAISZ, 1999). Isto também foi descrito em ratos submetidos a um curto período de tireotoxicose (KUNG & NG, 1994).

Acredita-se que o remodelamento ósseo, provavelmente, foi provocado pelo estado hipertireóideo, visto que tanto a OC como o ICTP apresentou excelente correlação positiva com a TT4 e um pouco inferior com a FT4. A FT4 não apresentou correlação positiva com o ICTP, com exceção em M2. Não foi observada correlação entre T4 e OC em um estudo realizado com 36 gatos com hipertireoidismo (ARCHER & TAYLOR, 1996), porém a correlação entre os marcadores do metabolismo ósseo e os hormônios tireoidianos foram descritos em humanos hipertireóideos (JÓDAR et al., 1997; GARNERO et al., 1993). Isto ocorre principalmente com o ICTP, descrito como um bom marcador indireto da avaliação do *status* da glândula tireóide (GARNERO et al., 1994). Neste estudo a correlação da ICTP com a TT4 foi excelente, porém um pouco inferior à apresentada pela OC.

Observou-se baixa correlação entre os marcadores do metabolismo ósseo e a densidade mineral óssea realizada pela técnica de densitometria óptica. Resultado semelhante foi descrito em pacientes recebendo doses supressivas de levotiroxina, ou seja, dose capaz de provocar hipertireoidismo subclínico (MARCOCCI et al., 1994). É importante salientar que a densitometria mineral óssea é uma das técnicas mais precisas na avaliação da atividade das células ósseas (DELAURIER et al., 2004). Porém a densitometria reflete somente uma fotografia do balanço ósseo em algum momento específico, enquanto que os marcadores do metabolismo ósseo refletem a atividade de formação e reabsorção em tempo real (ALLEN, 2003; ALLEN et al., 2000). Os

resultados sugerem que a mensuração da OC e do ICTP deve ser utilizada com cautela no acompanhamento do hipertireoidismo felino por terem apresentado baixa correlação com a DMO.

Existem semelhanças nas alterações do tecido ósseo na tireotoxicose de origem exógena e endógena em humanos, conforme descrito em mulheres submetidas a uma reposição hormonal excessiva (KUNG & NG, 1994), estes resultados sugerem que o mesmo possa ocorrer em gatos. Possivelmente a perda de massa óssea, observada neste estudo, também ocorrerá de forma semelhante no hipertireoidismo felino de origem endógena. Em humanos o hipertireoidismo é mais um fator de risco de osteoporose (JÓDAR et al., 1997), visto que os hormônios tireoidianos proporcionam uma maior fragilidade do osso e com isso aumenta o risco de fraturas patológicas decorrentes da osteoporose (SCHARLA et al., 1999; JODAR et al., 1997; SEEGER, 1997; FOLDES et al., 1993). Nos gatos utilizados nesta pesquisa, esse fator agravante não ocorreu durante o período experimental. Isto também pode decorrer em virtude do tempo da tireotoxicose nos gatos estudados, visto que o período de remodelamento ósseo em paciente humano sadio requer mais de seis meses (MARCOCCI et al., 1994) e é provável que o mesmo ocorra em felinos. Porém, para CONFIRMAÇÃO desta hipótese há necessidade de estudos histomorfométricos.

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

Este estudo conclui que kits para mensuração da osteocalcina e do ICTP humano podem ser usados em felinos com o objetivo de avaliar as alterações no remodelamento ósseo, enquanto o kit para avaliação do PINP humano não deve ser utilizado em gatos. Conclui-se também que a OC e o ICTP em gatos com idade entre um e três anos de idade não apresentam correlação entre si, bem como com a DMO. A mensuração sérica dos marcadores da formação óssea (OC) ou da reabsorção óssea (ICTP) representa um meio simples e não invasivo de avaliação do metabolismo ósseo. Entretanto, mais estudos são necessários antes da aplicação clínica destes marcadores do metabolismo ósseo em felinos, em virtude de suas baixas correlações com a DMO, uma técnica padrão-ouro na avaliação óssea.

O hipertireoidismo em gatos adultos jovens sem doenças concomitantes não apresentaram hiperparatireoidismo secundário; mas, se observou aumento do PTH e diminuição do cálcio ionizado. Os efeitos combinados dos hormônios tireoidianos e do PTH contribuíram com a diminuição da DMO. Além disso, no presente estudo os hormônios tireoidianos não provocaram hiperfosfatemia, um dos achados importantes do hiperparatireoidismo.

Conclui-se que o excesso dos hormônios tireoidianos em gatos provocou aumento do remodelamento ósseo visto que ocorreu alta correlação entre estes hormônios e os marcadores do metabolismo ósseo. Conclui-se também que a tireotoxicose não foi suficiente para elevar os níveis séricos do ICTP, sugerindo que nos estágios precoces não há predomínio da atividade osteoclástica. O hipertireoidismo provocou diminuição da DMO óssea, porém a OC e o ICTP apresentaram baixa correlação com esta variável, sugerindo que o uso isolado dos marcadores do metabolismo ósseo deve ser usado com cautela na avaliação da perda de massa óssea em gatos com hipertireoidismo.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ADLIN, E. V., MAURER, A. H., MARKS, A. D., CHANNIICK, B.J. Bone mineral density in postmenopausal women treated with L-Thyroxine. **Am. J. Med.**, v.90, p.360-6, 1991.

ALLAIN, T.J., MCGREGOR, A.M. Thyroid hormones and bone. **Journal Endocrinology**, v.139, p.9-18,1992.

ALLEN, L.C., ALLEN, M.J., BREUR, G.J., HOFFAMANN, W.E., RICHARDSON, D.C. A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. **Research Vet. Sc.**, v. 68, p.231-235, 2000.

ALLEN, M.J. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. **Vet. Clinical Pathol.**, v.32, n.3, p.101-113, 2003.

ALLEN, M.J., HOFFAMANN, W.E., BREUR, G.J., RICHARDSON, D.C. Serum markers of bone metabolism in dogs. **Research Vet. Sc.**, v.59, p.250-254, 1998.

ARCHER, J.T., TAYLOR, S.M. Alkaline phosphatase bone isoenzyme and osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. **Can. Vet. Journal**, v.37, p.735-739, 1996.

AUWERX, J., BOUILLON, R. Mineral and bone metabolism in thyroid disease: a review. **Quarterly Journal of Medicine**, v.60, n. 232, p.737-52, 1986.

BARBER P. J., ELLIOT, J. Study of calcium homeostasis in feline hyperthyroidism. **Journal of Small Animal Practice**, v.37, p.575-82, 1996.

BARBER, P.J. Disorders of the parathyroid glands. **J. Feline Medicine Surgery**, v.6, p.259-269, 2004.

BARBER, P.J., ELLIOT, J., TORRANCE, A.G. Measurement of feline intact parathyroid hormone: assay validation and sample handling studies. **J. Small Animal Practice**, v.34, p.614-620, 1993.

BEIGEL, Y., ARIE, R., WYSENBECK, A. J., HALABE, E., BLUM, I. Hypocalcaemia, a possible manifestation of thyrotoxicosis. **Postgraduate Medical Journal**, v.59, p.317-9, 1983.

BREUR, G.J., ALLEN, M.J., CARLSON, S.J., RICHARDSON, D.C. Markers of bone metabolism in dog breeds of different size. **Research Vet. Sc.**, v. 76, p.53-55, 2004.

BROUSSARD, J.D., PETERSON, M.E., FOX, P.R. Changes in the clinical and laboratory findings in hyperthyroid cats from 1983 to 1993. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 206, p.302-5, 1995

CALVO, M.S., EASTELL, R. OFFORD, K.P., BERGSTRALH, E.J., BURRITT., M.F. Circadian variation in ionized calcium and intact parathyroid hormone: evidence for sex differences in calcium homeostasis. **Journal Endocrinology and Metabolism**, v.72, p.69-76, 1991.

CARDOSO, M.J.L. Avaliação dos efeitos cardíacos, radiográficos, eletrocardiográficos, do hemograma e nos níveis séricos de uréia, creatinina, sódio, potássio e enzimas hepáticas, em gatos com hipertiroidismo experimental. Botucatu: UNESP, 2002, p.174, Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

CHATTOPADNYAY, N. Biochemistry, physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. **Intern. J. Biochemistry Cell Biology**, v.32, p.789-804, 2000.

CHAVASSIEUX, P., GARNERO, P., DUBOEUF, F., VERGNAUD, P., BRUNNER-FERBER, F., DELMAS, P.D., MEUNIER, P.J. Effects of a new selective estrogen receptor modulator (Mdl 103,323) on cancellous and cortical bone in ovariectomized ewes: a biochemical, histomorphometric, and densitometric study. **J. Bone Min. Research**, v.16, p.89-96, 2001.

CHRISTGAU, S., ROSENQUIST, C., ALEXANDERSON, P., BJARNASON, N.H., RAVN, P., FLEDELIUS, C., HERLING, C., QVIST, P., CHRISTIANSEN, C. Clinical evaluation of the Serum CroosLaps One Step Elisa, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. **Clinical Chemistry**, v.44, p.2290-2300, 1998.

COLEMAN, R.E. The clinical use of bone resorption markers in patients with malignant bone disease. **Cancer**, v.94, p.2521-2533, 2002.

COSTA, F.S. Tirotoxicose experimental em gatos: Efeitos sobre o tecido ósseo, níveis séricos de fosfatase alcalina e metabolismo de cálcio e fósforo. Botucatu, 2002. 101p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista de Botucatu - SP.

DELAURIER, A., JACKSON, B., PFEIFER, D., INGHAM, K., HORTON, M.A., PRICE, J.S. A comparison of methods for measuring serum and urinary

markers of bone metabolism in cats. **Research Vet. Science**, v.77, p.29-39, 2004.

DELMAS, P.D. Bone marker nomenclature. **Bone**, v.28, p.575, 2001.

DELMAS, P.D., EASTELL, R., GARNERO, P., SEIBEL, M.J., STEPAN, J. Radioimmunoassay for the pyridoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen turnover. **Osteoporos Int.**, v.11 (suppl),n.6, S2-S17, 2000.

DELMAS, P.D., GINEYTS, E., BERTHOLIN, A., GARNERO, P., MARCHAND, F. Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget's disease. **J. Bone Min. Research**, v.8, p.643-648, 1993.

DIAMOND, T., NERY L., HALES, I. A therapeutic dilemma: suppressive doses of thyroxine significantly reduce bone mineral measurements in both premenopausal and postmenopausal women with thyroid carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.72, n.1, p.184s, 1991.

EBELING, P.R., PETERSON, J.M., RIGGS, B.L. Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. **J Bone Miner Res.**, v.7, p.1243-1250, 1992.

ERIKSEN, E.F., CHARLES, P., MELSEN, F. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation to bone histomorphometry. **J Bone Miner Res**, 8: 127-32, 1993.

FALLON M. D., PERRY, H. M., BERGFELD, M., DROKE, D., TEITELBAUM, S. L., AVIOLI, L. V. Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis. **Arch. Intern. Med.**, v. 143, p.442-4, 1983.

FELDMAN, E.C. Distúrbios das paratireóides. IN: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 5ª ed. São Paulo: Editora Guanabara. 2004. p.1454-1474.

FOSTER, D.J., THODAY, K.L. Tissue sources of serum alkaline phosphatase in 34 hyperthyroid cats: a qualitative and quantitative study. **Research Veterinary Science.**, v.68, p.89-94, 2000.

FOX, D.B., COOK, J.L. Synovial fluid markers of osteoarthritis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.219, p.756-761, 2001.

FRANCIS, D.A., MILLIS, D.L. Trends observed in bone metabolism markers from dogs following radial ostectomy. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, v.2, p.A5, 2002.

FRASER, S. A., SMITH, D. A., ANDERSON, J. B. WILSON, G. M. Osteoporosis and fractures following thyrotoxicosis. **Lancet**, p.981-3, 1971.

GARNERO, P., VASSY, V., BERTHOLIN, A., RIOU, J.P., DELMAS, P.D. Markers of bone turnover in hyperthyroidism and the effects of treatment. **J. Clinical Endocrinol. Metab.**, v.78, n.4, p.955-959, 1994.

GARZOTTO, C.K., BERG, J., HOFFMANN, W.E., RAND, W.M. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v.14, p.587-592, 2000.

GOUVEIA, C. H. A., JORGETTI, V., BIANCO, A.C. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. **J. Bone Miner. Res.**, v.12, p.2098-107, 1997.

GUNDBERG, C.M.; HAUSCHKA, P.V.; LIAN, J.B. & GALLOP, P.M. Osteocalcin: isolation, characterization and detection. **Methods in Enzymology**, v. 107, p. 516- 44, 1984.

HANSON, D.A., WEIS, M.A.E., BOLLEN, A.M. et al. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptide in urine. **J Bone Miner Res**, v.7, n.11, 1.251-8, 1992.

HAUSCHKA, P.V & WIANS, F.H. Osteocalcina – hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. **Anatomical Record**, v. 224, p. 180- 8, 1989.

HOLTENIUS, K., EKELUND, A. Biochemical markers of bone turnover in the dairy cow during lactation and dry period. **Research Veterinary Science**, v.78, p.17-19, 2005.

HORNEY, B.S., FARMER, A.J., HONOR, D.J., MACKENZIE, A.J., BURTON, S. Agarose gel electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes in the serum of hyperthyroid cats. **Vet. Clin. Pathol.**, v.23, p.98-102, 1995.

JOFFE, P., HEAF, J.G., HYLDSTRUP, L. Osteocalcin: a non-invasive index of metabolic bone disease in patients treated by CAPD. **Kidney**, v.46, p.838-846, 1994.

JOHNSON, R.B., GILBERT, J.A., COOPER, R.C., DAÍ, X., NEWTON, B.I., TRACY, R.R., WEST, W.F., DEMOSS, T.L., MYERS, P.J., STRECKFUS, C.F. Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. **J. Periodontology**, v.68, p.864-871, 1997.

- KAPTEIN, E.M., HAYS, M.T., FERGUSON, D. Thyroid hormone metabolism: A comparative evaluation. **Vet. Clin. North Am.: Small An. Pract.**, v.24, p.431-466, 1994.
- KITAMURA, N., SHIIGENO, C., SHIOMI, K., LEE, K., OHTA, S., SONE, T., KATSUSHIMA, S., TADAMURA, E., KOUSAKA, T., YAMAMOTO, I., DOKOH, S., KONISHI, J. Episodio fluctuation in serum intact parathyroid hormona concentration in men. **Journal Endocrinology and Metabolism**, v.70, p.252-263, 1990.
- KUNG, A. W., NG, F. A rat model of thyroid hormone-induced bone loss: effectof antiresorptive agents on regional bone density and osteocalcin gene expression. **Thyroid**, v.4, n.1, p.93-8, 1994.
- LEE, M.S., KIM, S.Y., LEE, M.C. Negative correlation between the change in bone mineral density and serum osteocalcin in patients with hyperthyroidism. **J. Clinical Endocrinol. Metab.**, v.70, p.766-770, 1990.
- LEONARD, C.A., TILLSON, M. Feline lameness. **Vet. Clin. North Am. Small Animal Pract.**, v.31, p.143-163, 2001.
- LIESEGANG, A., EICHER, R., SASSI, M.L., RISTELI, J., KRAENZLIN, M., RIOND, J.L., WANNER, M., Biochemical markers of bone formation and resorption aroun parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. **J. Dairy Sc.**, v.83, p.1773-81, 2000.
- LINKHART SG, LINKHART TA, TAYLOR AK et al. Syntetic peptide-based immunoassay for amino-terminal propeptide of type I procollagen: application for evaluation of bone formation. **Clin Chem**, v.39, n.11, p.2.254-8, 1993.
- LOUZADA, M. J. Q. **Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas em peças ósseas – estudo “in vitro”**. Campinas, 1994. 191p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Estadual de Campinas.
- LOUZADA, M. J. Q., BELANGERO, W. D., PELÁ, C. A., SANTOS - PINTO, R. Avaliações da densidade óssea em radiografias – I metodologia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA, 30, 1996, Curitiba. **Anais**.
- MELKKO J, NIEMI S, RISTELI L, RISTELI J. Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. **Clin Chem**, v.36, p.1.328-32, 1990.

MOONEY, C.T, THODAY, K.L., DOXEY, D.L. Serum thyroxine and triiodothyronine responses of hyperthyroid cats to thyrotropin. **Am. J. Vet. Res.**, v.57, p.987-91. 1996a.

MOONEY, C.T. Feline hyperthyroidism: diagnosis and therapeutics. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 31, p.963-83, 2001.

MOONEY, C.T., LITTLE, C.J.L., MACRAE, A.W. Effect of illness not associated with the thyroid gland on serum total and free thyroxine concentrations in cats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.208, p. 2004-08, 1996b.

MORA, S. PITUKCHEEWANONT, P., KAUFMAN, F.R., NELSON, J.C., GILSANZ, V. Biochemical markers of bone turnover and the volume and the density of bone children at different stages of sexual development. **J. Bone Miner. Res.** v.14, p.1664-71, 1999.

MOSEKILDE, L., CHRISTENSEN, M. S. Decreased parathyroid function in hyperthyroidism: interrelationships between serum parathyroid hormone, calcium-phosphorus metabolism and thyroid function. **Acta Endocrinologica**, v. 84, p.566-75, 1977.

MOSEKILDE, L., ERIKSEN, E. F., CHARLES, P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v.19, n.1, p.35-63, 1990.

NIELSEN, H.K. Circadian and circatrigean changes in osteoblastic activity assessed by serum osteocalcin. **Danish Medical Bulletin**, v. 41, p. 216- 27, 1994.

PARFITT AM, SIMON LS, VILLANUEVA AR, KRANE SM. Procollagen type I carboxy terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. **J Bone Miner Res**, v.2, p.427-36, 1987.

PETERSON, M. E., KINTZER, P. P., CAVANAGH, P. G., FOX, P. R., FERGUSON, D. C., JOHNSON, G. F., BECKER, D. V. Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.183, n.1, p.103-10, 1983.

PETERSON, M.E. Afecções hipertiróideas. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4 ed. São Paulo. Manole, 1997. Cap.114, p.2025-53.

PETERSON, M.E., FERGUSON, D.C. Doenças Tiroidianas. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3 ed. São Paulo. Manole, 1992. Cap. 95, p. 1706-51.

PETERSON, M.E., MELIÁN, C., NICHOLS, R. Measurement of serum concentrations free thyroxine, total thyroxine, and total triiodothyronine in cats with hyperthyroidism and cats with nonthyroidal disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.218, p.529-536, 2001.

PHILIPPOV, J.P., PASCALEV, M.D., AMINKOV, B.Y., GROSEV, C.D. Changes in serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen in an experimental model of canine osteomyelitis. **Calcified Tissue Int.**, v.57, p.152-154, 1995.

POLLARD, R.E., LONG, C.D., NELSON, R.W., HORNOF, W.F., FELDMAN, E.C. Percutaneous ultrasonographically guided radiofrequency heat ablation for treatment of primary hyperparathyroidism in dogs. **J. Am. Vet. Méd. Assoc.**, v.218, n.7, p.1106-10, 2001.

PRICE, J.S., JACKSON, B., EASTELL, R., GOODSHIP, A.E., BLUMSOHN, A., WRIGHT, I., STONEHAM, S., LANYON, L.E., RUSSEL, R.G. Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. **Equine Vet. J.**, v.27, p.201-207, 1995.

PRICE, J.S., JACKSON, B., GRAY, J.A., HARRIS, P.A., WRIGHT, I., PFEIFFER, D.U., ROBINS, S.P., EASTELL, R., RICKETTS, S.W. biochemical markers of bone metabolism in growing throughbreds: a longitudinal study. **Research Vet. Sc.**, v.71, p.37-44, 2001.

RAHAL, S. C., MORTARI, A. C., CAPORALI, E. H. G., VULCANO, L. C., SANTOS, F. A. M., TAKARIRA, R. K., CROCCI, A.J. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. **Ciência Rural**, v.32, n.3, p.421-425, 2002.

RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clin Chem**, v.45, n.8, p.1353-1358, 1999.

REMES, T., VÄISÄNEN, S.B., MAHONEN, A., HUUSKONEN, J., KRÖGER, H., JURVELIN, J.S., PENTILÄ, I.M., RAURAMAA, R. The association of bone metabolism with bone mineral density, serum sex hormone concentrations, and regular exercise in middle-aged men. **Bone**, v.34, p.439-447, 2004.

- RHONE, D.P., BERLINGER, F.R., WHITE, F.M. Tissue sources of elevated serum alkaline phosphatase activity in hyperthyroid patients. **Am. J. Clin. Pathol.**, p.381-386, 1980.
- RISTELI J, ELOMAA S, TRIVEDI P, MÅENTAUSTA O, ROWE DW. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone resorption. **Clin Chem**, 39(4): 635-40, 1993.
- RIZZOLI, R., POSER, J., BARGI, U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. **Metabolism**, v.35, p.71-74, 1986.
- ROBINS, S.P. Collagen crosslinks in metabolic bone disease. **Acta Orthop Scand.**, v.66, p.171-175, 1995.
- ROSOL, T.J.; CAPEN, C.C.: Calcium-Regulating Hormones and Diseases of Abnormal Mineral (Calcium, Phosphorus, Magnesium) Metabolism. In: KANECO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. California: Academic Press, 5 ed., p. 619-702, 1997.
- SCHARLA, S. H., WOLF, S., DÜLL, R., LEMPert, U. G. Prevalence of low bone mass and endocrine disorders in hip fracture patients in Southern Germany. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v.107, p.547-54, 1999.
- SEIBEL, M.J. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. **Osteoporosis Internacional**, v.11, p.18-29, 2000.
- SEIBEL, M.J., DUNCAN, A., ROBINS, S.P. Urinary hydroxypyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic aspects. **J. Reumatol.**, v.16, p.964-970, 1989.
- SERAKIDES, R., NUNES, V.A., NASCIMENTO, E.F., SILVA, C.M., RIBEIRO, A.F.C. Relação tireóide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecn.**, v.52, p.579-585, 2000.
- SWAMINATHAN, R. Biochemical markers of bone turnover. **Clin. Chim. Acta**. V.313, p;95-105, 2001.
- THIEDE, M.A., SMOCK, S.L., PETERSEN, D.N., GRASSER, W.A., THOMPSON, D.D., NISHIMOTO, S.K. Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megacariócitos and peripheral blood platelets. **Endocrinol.**, v.135, p.929-937, 1994.

THODAY, K.L., MOONEY, C.T. Historical clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. **Vet. Rec.**, v.131, p.257-64, 1992.

TORIBIO, R.E., KOHN, C.W., CHEW, D.J., CAPEN, C.C., ROSOL, T.J. cloning and sequence analysis of the complementary DNA for feline preproparathyroid hormone. **Am. J. Vet. Research**, v.63, p.194-197, 2002.

TRIVEDI P, RISTELI J, RISTELI L et al. Serum concentrations of the type I and III procollagen propeptides as biochemical markers of growth velocity in healthy infants and children and in children with growth disorders. **Pediatr Res**, v.30, n.3, p.276-80, 1991.

VULCANO, L. C., LEAL, A. C. R., LOUZADA, M. J. Q., MUNIZ, L. M. R., MAMPRIM, M. J. Determination of the normal values of density of the radius in Rottweilers, using radiographic optical densitometry (experimental study). In: CONGRESSO MUNDIAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DE PEQUENOS ANIMAIS, 1998, Buenos Aires, **Anais**.

WATTS, N.B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v.45, n.8B, p.1359-1368, 1999.

WEILER, H.A., WANG, Z., ATKINSON, S.A. Dexamethasone treatment impairs calcium regulation and reduces bone mineralization in infant pigs. **Am. J. Clin, Nutrit.**, v.61, p.805-811, 1995.

Anexos

Material e Métodos

Foram utilizados quatorze gatos sem raça definida, nove fêmeas e cinco machos, não castrados, com idade entre um e três anos. O estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP, Botucatu, SP.

Os animais foram mantidos em jaulas individuais de ferro esmaltado, alimentados com ração seca comercial¹ e água a vontade. Os estudos se iniciaram após um período de 15 dias de adaptação dos gatos ao ambiente e manejo. No início deste período os animais foram vacinados contra raiva², panleucopenia felina, rinotraqueíte e calicivirose³, receberam vermífugo⁴ e tratamento com antiparasitário tópico⁵.

A tireotoxicose foi induzida pela administração oral, de comprimidos, de levotiroxina sódica (150µg/kg/dia) durante 42 dias. A administração do hormônio era realizada às seis horas da manhã. Semanalmente, os gatos eram pesados e para os animais que apresentavam diminuição do peso corporal secundário aos efeitos do excesso dos hormônios tireoidianos, as doses de levotiroxina sódica foram recalculadas e ajustadas para a manutenção da dose de 150 µg/kg/dia.

Os animais foram avaliados em quatro momentos (M), sendo que o M0, feito antes da administração da levotiroxina sódica, resultou nos valores basais dos diversos parâmetros estudados. Durante o período experimental, cuja duração foi de 42 dias, foram considerados outros três momentos de avaliação: aos 14 dias (M1), aos 28 dias (M2) e aos 42 dias (M3). As colheitas de sangue, para obtenção do soro foram realizadas entre 9 e 10 horas da manhã, cerca de três a quatro horas após a administração da levotiroxina sódica, pois é nesse tempo que ocorre o pico de concentração da tiroxina em gatos (Hays et al., 1992). Além disso, o meio da manhã é o horário preferível para a colheita de sangue para a mensuração do PTH em felinos (Barber, 2004).

Colheita das amostras

¹ Whiskas® Frango. Div. Éffem Produtos Alimentícios. Br 116, Km 286, Eldorado do Sul, RS.

² Defensor®. Pfizer Divisão de Saúde Animal. Guarulhos – SP.

³ Felocell® CVR. Pfizer Divisão de Saúde Animal. Guarulhos – SP.

⁴ Drontal® Gatos. Bayer S/A do Brasil. São Paulo – SP.

⁵ FrontLine®. Merial Saúde Animal Ltda. Fazenda São Francisco – Paulínia – SP.

As amostras de sangue foram obtidas da veia jugular dentro de tubos contendo gel ativador de coágulo. Os tubos foram centrifugados a 2000g por 10 minutos em menos de uma hora após a colheita. Depois da separação do soro as amostras foram alíquotadas em cinco frascos de 1,2 mL e congeladas em freezer a -70°C até o momento da realização dos testes.

Perfil Bioquímico Sérico

As mensurações séricas do cálcio total e fósforo foram realizadas utilizando aparelho multicanal automatizado para as análises bioquímicas (Hitachi 911).

Cálcio Ionizado

O cálcio ionizado foi mensurado utilizando-se aparelho de hemogasimetria.

Mensuração da Tiroxina Total (TT4)

A mensuração das concentrações séricas da TT4 foi realizada pela técnica de RIE em fase sólida, utilizando kit comercial⁶. O protocolo recomendado pelo fabricante para a realização das mensurações não foi alterado. Este kit utilizado consiste em tubos ligados a anticorpos e calibradores séricos humanos. O T4 marcado com o iodorradioativo (I^{125}) compete, em determinado tempo, com o T4 da amostra do paciente para se fixar nos anticorpos, na presença de agentes bloqueadores das proteínas de ligação dos hormônios tireoidianos. A contagem da radioatividade do anticorpo ligado e marcado foi obtida pela utilização de contador gama automático, calibrado automaticamente para I^{125} e tempo de contagem de um minuto. Os resultados foram obtidos automaticamente, pelo uso de programa específico de computador, acoplado ao contador gama e impressora. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata e as concentrações foram calculadas pela média das mensurações das amostras em duplicata. As amostras em duplicata com coeficiente de variação maior que 15% foram excluídas da análise deste estudo. O teste detecta concentração de TT4 de 0 a 24 $\mu\text{g/dl}$, com sensibilidade mínima descrita de 0,25 $\mu\text{g/dl}$.

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da mensuração em duplicata das amostras foram usados para a determinação da

⁶ Coat-Count Total T4, DPC, Los Angeles, Estados Unidos da América

precisão intra-ensaio da TT4 sérica. Para a determinação da precisão foram feitos "pool" (n=16) de cada momento. Cada "pool" foi testado seis vezes dentro do mesmo teste. A média, o desvio padrão e o CV foram determinados para cada "pool" e a média do CV dos momentos foi definido como a precisão inter-ensaio da TT4 sérica.

Mensuração da Tiroxina Livre (FT4)

A mensuração das concentrações séricas da FT4 foi realizada pela técnica de RIE em fase sólida, utilizando kit comercial⁷. O protocolo recomendado pelo fabricante para a realização das mensurações não foi alterado. Este kit utilizado consiste em tubos ligados a anticorpos e calibradores séricos humanos. O T4 livre marcado com o iodoradioativo (I^{125}) compete, em determinado tempo, com o T4 livre da amostra do paciente para se fixar nos anticorpos. A contagem da radioatividade do anticorpo ligado e marcado foi obtida pela utilização de contador gama automático, calibrado automaticamente para I^{125} e tempo de contagem de um minuto. Os resultados foram obtidos automaticamente, pelo uso de programa específico de computador, acoplado ao contador gama e impressora. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata e as concentrações foram calculadas pela média da mensuração das amostras em duplicata. As amostras em duplicata com coeficiente de variação maior que 15% foram excluídas da análise deste estudo. O teste detecta concentração da FT4 de 0 a 10 ng/dl, com sensibilidade mínima descrita de 0,15 ng/dl.

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da mensuração em duplicata das amostras foram usados para a determinação da precisão intra-ensaio da FT4 sérica. Para a determinação da precisão foram feitos "pool" (n=16) de cada momento. Cada "pool" foi testado seis vezes dentro do mesmo teste. A média, o desvio padrão e o CV foram determinados para cada "pool" e a média do CV dos momentos foi definido como a precisão inter-ensaio da FT4 sérica.

Mensuração do PTH Intacto

A mensuração do PTH intacto foi realizada utilizando-se de kit comercial para o teste imunoradiométrico (RIMA)⁸. O protocolo recomendado pelo

⁷ Coat-Count Free T4, DPC, Los Angeles, Estados Unidos da América

⁸ PTH Intacto, DSL, Texas, Estados Unidos da América

fabricante para a realização das mensurações não foi alterado. Este teste para o PTH Intacto utiliza dois anticorpos dirigidos para fragmentos do PTH aminoterminal e carboxiterminal não sobrepostos, respectivamente. O PTH intacto presente na amostra serve para ligar os dois anticorpos, um dos quais possui um marcador radioativo. O RIMA é um teste não competitivo, onde o PTH a ser testado forma um "sanduíche" entre os dois anticorpos. O primeiro anticorpo está ligado às paredes dos tubos. O outro anticorpo é radioativamente marcado para a detecção. O PTH presente nas amostras, padrões e controles está ligado por dois anticorpos e forma um complexo "sanduíche". A contagem da radioatividade deste complexo foi obtida pela utilização de contador gama automático, calibrado automaticamente para I^{125} e tempo de contagem de um minuto. Os resultados foram obtidos automaticamente, pelo uso de programa específico de computador, acoplado ao contador gama e impressora. As porções não ligadas são removidas por decantação e lavagem dos tubos. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata e as concentrações foram calculadas pela média da mensuração das amostras em duplicata. As amostras em duplicata com coeficiente de variação maior que 15% foram excluídas da análise deste estudo. O teste detecta concentração de PTH entre 0 e 2000 $\mu\text{g/ml}$, com sensibilidade mínima descrita de 10 pg/ml .

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da mensuração em duplicata das amostras foram usados para a determinação da precisão intra-ensaio do PTH sérico. Para a determinação da precisão foram feitos "pool" ($n=16$) de cada momento. Cada "pool" foi testado seis vezes dentro do mesmo teste. A média, o desvio padrão e o CV foram determinados para cada "pool" e a média do CV dos momentos foi definido como a precisão inter-ensaio do PTH sérico.

Mensuração do PINP

A mensuração das concentrações séricas de PINP foi realizada usando kit humano comercial para RIE⁹. O protocolo recomendado pelo fabricante para a realização das mensurações não foi alterado. O RIE é um teste competitivo, onde a amostra para a dosagem do PINP (50 μl de soro, em duplicata) compete

⁹ Procollagen PINP, Orion Diagnostica, Espoo, Finlândia

com o PINP marcado com o I^{125} pelos sítios de ligação ao anticorpo policlonal de coelho anti-PINP. A contagem da radioatividade do anticorpo ligado e marcado foi obtida pela utilização de contador gama automático, calibrado automaticamente para I^{125} e tempo de contagem de um minuto. Os resultados foram obtidos automaticamente, pelo uso de programa específico de computador, acoplado ao contador gama e impressora. A porção livre (não ligada) do PINP marcado é inversamente proporcional à concentração do PINP da amostra teste. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata e as concentrações foram calculadas pela média da mensuração das amostras em duplicata. As amostras em duplicata com coeficiente de variação maior que 15% foram excluídas da análise deste estudo. O teste detecta concentração de PINP de humanos entre 0 e 250 ng/ml, com sensibilidade mínima descrita de 2 ng/ml.

Mensuração do ICTP

A mensuração das concentrações séricas de ICTP foi realizada através usando-se kit humano comercial para RIE¹⁰. O protocolo recomendado pelo fabricante para a realização das mensurações não foi alterado. O RIE é um teste competitivo, onde a amostra para a dosagem do ICTP (50µl de soro, em duplicata) compete com o ICTP marcado com o iodoradioativo (I^{125}) pelos sítios de ligação ao anticorpo policlonal de coelho anti-ICTP. A contagem de radioatividade do anticorpo ligado e marcado foi obtida pela utilização de contador gama automático, calibrado automaticamente para I^{125} e tempo de contagem de um minuto. Os resultados foram obtidos automaticamente, pelo uso de programa específico de computador, acoplado ao contador gama e impressora. A porção livre (não ligada) do ICTP marcado é inversamente proporcional a concentração do ICTP da mostra teste. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata e as concentrações foram calculadas pela média da mensuração das amostras em duplicata. As amostras em duplicata com coeficiente de variação maior que 15% foram excluídas da análise deste estudo. O teste detecta concentração de ICTP de humanos entre 0 e 50 µg/l, com sensibilidade mínima descrita de 0,4 µg/l.

Mensuração da Osteocalcina

¹⁰ Collagen ICTP, Orion Diagnostica, Espoo, Finlândia

A mensuração das concentrações séricas de osteocalcina foi realizada usando kit humano comercial para o teste imunoradiométrico (RIMA)¹¹. O protocolo recomendado pelo fabricante para a realização das mensurações não foi alterado. O RIMA é um teste não competitivo, onde a osteocalcina a ser testada forma um "sanduíche" entre os dois anticorpos. O primeiro anticorpo está ligado às paredes dos tubos. O outro anticorpo é radioativamente marcado para a detecção. A osteocalcina presente nas amostras, padrões e controles está ligada a dois anticorpos e formam um complexo "sanduíche". A contagem da radioatividade deste complexo foi obtida pela utilização de contador gama automático, calibrado automaticamente para I¹²⁵ e tempo de contagem de um minuto. Os resultados foram obtidos automaticamente, pelo uso de programa específico de computador, acoplado ao contador gama e impressora. As porções não ligadas são removidas por decantação e lavagem dos tubos. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata e as concentrações foram calculadas pela média da mensuração das amostras em duplicata. As amostras em duplicata com coeficiente de variação maior que 15% foram excluídas da análise deste estudo. O teste detecta concentração de osteocalcina de humanos entre 0 e 60 µg/ml, com sensibilidade mínima descrita de 0,3 ng/ml.

Coeficiente de Variação

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da mensuração em duplicata das amostras foram usados para a determinação da precisão intra-ensaio dos hormônios e dos marcadores do metabolismo ósseo séricos. Para a determinação da precisão foram feitos "pool" (n=16) de cada momento. Cada "pool" foi testado seis vezes dentro do mesmo teste. A média, o desvio padrão e o CV foram determinados para cada "pool" e a média do CV dos momentos foi definido como a precisão inter-ensaio dos hormônios e dos marcadores do metabolismo ósseo séricos.

¹¹ Osteocalcina, DSL, Texas, Estados Unidos da América

Densitometria Mineral Óssea

A avaliação da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio direito foi realizada pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas, conforme descrito na literatura (RAHAL et al., 2002; VULCANO et al., 1998), em quatro momentos. Para melhor análise seqüencial dos valores densitométricos, padronizou-se a seleção da região da metáfise localizada 5mm acima da cicatriz epifisária.

Para este procedimento foi necessária a realização, em todos os momentos, de três radiografias em projeção crânio-caudal do membro anterior direito de cada animal, abrangendo a região de extremidade distal do rádio e da ulna. As radiografias foram realizadas momentos antes do início da indução à tirotoxicose nos gatos, sendo repetidas com um intervalo de sete dias, até se completarem 42 dias de tratamento com levotiroxina sódica.

No exame radiológico foram utilizados filmes radiográficos¹² e chassis 18x24cm equipados com écrans de terras raras. Paralelamente e distante 3cm do membro radiografado, foi colocada uma escala de alumínio (phantom) na porção central do chassi, acoplado a um suporte de madeira, servindo como referencial densitométrico. O phantom era constituído de vinte degraus, sendo o primeiro com 0,5mm de espessura, variando em seguida de 0,5 em 0,5mm até o vigésimo degrau, tendo cada degrau uma área de 225mm².

O aparelho de raios-X¹³ utilizado foi calibrado a uma distância foco-filme de 90cm e, em todos os procedimentos radiográficos, foi mantida uma quilovoltagem fixa de 35 kVp para todos os animais em todos os momentos. A miliamperagem e o tempo de exposição à radiação X foram ajustados de acordo com a necessidade de cada animal no primeiro exame, propiciando uma adequada imagem radiográfica, sendo estes valores mantidos até o término do experimento. Para os processos de revelação¹⁴ e fixação¹⁵ do filme radiográfico, foi utilizada uma processadora automática padrão¹⁶.

Após a obtenção das imagens radiográficas, as mesmas foram digitalizadas, utilizando-se um Scanner HP Scanjet 4C, com um adaptador para

¹³ TUR D 800, 500 Ma.

¹⁴ Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda.

¹⁵ Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda.

¹⁶ Macrotec.

transparência HP Scanjet 4C. Uma vez digitalizadas, por meio um programa HP Deskscan, as imagens foram armazenadas em microcomputador. Utilizando-se um programa computacional (Software)¹⁷ de Louzada (1994), as imagens foram avaliadas para determinação e análise da densidade mineral óssea dos terços distais dos raios dos gatos utilizados no experimento. As etapas da metodologia utilizada para a leitura densitométrica são descritas a seguir:

- 1- Identificação do paciente com dados referentes ao nome, código do exame, raça, idade, peso e data.
- 2- Seleção da imagem a ser analisada, de acordo com seu código de identificação previamente estabelecido.
- 3- Localização dos posicionadores circulares.
- 4- Enquadramento da região da imagem radiográfica a ser avaliada, abrangendo a extremidade distal do rádio direito.
- 5- Calibração do phantom.
- 6- Localização da cicatriz epifisária da extremidade distal do rádio, com o posicionamento do eixo sobre esta estrutura.
- 7- Marcação de uma reta localizada 5mm acima da cicatriz epifisária do rádio, servindo como referência para início da seleção da região ("janela") a ser realizada a leitura da densidade mineral óssea.
- 8- Delimitação de uma "janela" para realização da leitura da densidade mineral óssea. Primeiramente os limites laterais da janela foram sobrepostos à porção mais externa das extremidades laterais do rádio. Em seguida, estabeleceu-se a altura da "janela" que correspondeu à metade da largura obtida anteriormente. Por último, aumentaram-se mais 4mm da largura da "janela" para abranger parte dos tecidos moles adjacentes, propiciando, assim, a análise densitométrica.
- 9- Ajustamento automático do mapeamento das partes moles adjacentes ao tecido ósseo. Nos casos em que o ajuste automático dos tecidos moles não foi satisfatório, foi realizado um ajuste manual pelo operador.
- 10- Cálculo da densidade mineral óssea em mmAl, a partir da região selecionada e adequado mapeamento das partes moles.

¹⁶ Athenas – Sistema de Inteligência Avançada – São José dos Campos

11-Para cada momento, realizaram-se três leituras densitométricas em cada radiografia, totalizando nove valores de densidade mineral óssea. O valor densitométrico final, para cada animal nos diferentes momentos, foi obtido por meio do cálculo da média dos nove valores.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)