

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**TIROTOXICOSE EXPERIMENTAL EM GATOS  
EFEITOS SOBRE O TECIDO ÓSSEO,  
ISOENZIMAS DA FOSFATASE ALCALINA E  
METALOPROTEINASES DE MATRIZ –2 E –9**

**FABIANO SÉLLOS COSTA**

**BOTUCATU-SP  
MARÇO/2006**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**TIROTOXICOSE EXPERIMENTAL EM GATOS  
EFEITOS SOBRE O TECIDO ÓSSEO,  
ISOENZIMAS DA FOSFATASE ALCALINA E  
METALOPROTEINASES DE MATRIZ –2 E –9**

**FABIANO SÉLLOS COSTA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária,

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucy Marie R. Muniz**

**BOTUCATU-SP  
MARÇO/2006**

**Composição da Banca Examinadora da Tese de autoria de Fabiano Séllos Costa apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, na data de 14 de março de 2006, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.**

---

**Profa. Dra. Lucy Marie Ribeiro Muniz**

---

**Prof. Dr. Luiz Carlos Vulcano**

---

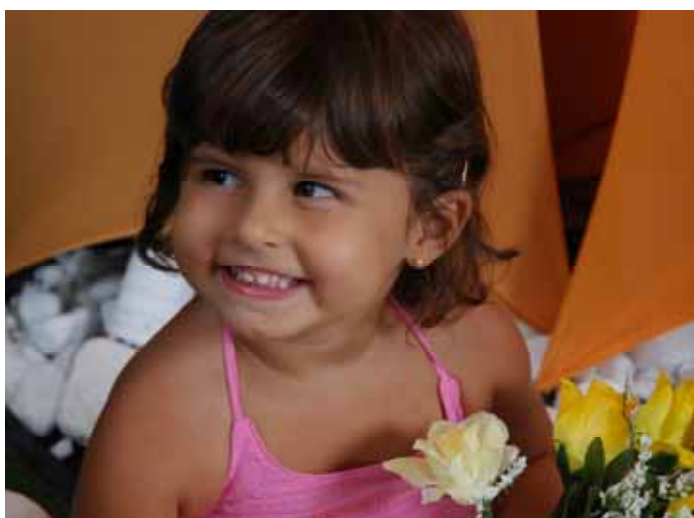
**Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos**

---

**Prof. Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Paes**

---

**Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior**



**Aos meus pais, meu irmão e minha querida filha Camile**

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração, direta ou indireta, de muitas pessoas, para as quais manifesto a mais profunda gratidão.

A Deus.

Aos animais utilizados neste experimento.

A toda a minha maravilhosa família, principalmente, minha filha, meu irmão, minha mãe e minha avó, pelo constante apoio e pela compreensão nos diversos momentos de ausência durante a realização deste trabalho.

Ao meu querido pai. Apesar de o destino ter nos separado tão cedo, sempre senti sua presença e procurei seguir seus ensinamentos. Espero que esteja feliz.

À minha querida orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucy Marie Ribeiro Muniz, pela oportunidade concedida, pelos inúmeros e valiosos ensinamentos e pelo tratamento sempre carinhoso, atencioso e paciente. Sou muito grato por tudo e terei a senhora como exemplo por toda a minha vida.

Ao grande amigo Mauro José Lahm Cardoso, pelo auxílio durante as etapas experimentais da pesquisa e pela agradável convivência ao longo do curso. Dizem que amigo é o irmão que nós podemos escolher e, com certeza, você é um deles.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Vulcano, pelos diversos ensinamentos, pela grande colaboração na realização da pesquisa e pelo agradável relacionamento durante todo o meu curso de pós-graduação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Jaqueline Mamprim, pelos ensinamentos passados, compreensão nos momentos de dificuldades e pela convivência sempre amigável.

Aos funcionários do Setor de Diagnóstico por Imagem da UNESP, Wilma Maria de Castro, Marco Antônio Fumes Pelicci, Neide Thiago de Souza e Benedito José Alho Favan, pelo grande auxílio nos procedimentos experimentais e pelo bom humor e dedicação na realização de suas tarefas.

Ao Prof. Dr. Alzido de Oliveira, por despertar o meu interesse pela pesquisa durante o período de iniciação científica e por diversos ensinamentos passados no aspecto pessoal e profissional. O senhor tem grande participação nesta conquista.

A todos os meus alunos e ex-alunos da Universidade do Oeste Paulista, do Centro Universitário de Vila Velha e da Universidade Federal do Espírito Santo. Com certeza aprendi muito com vocês.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade concedida para a realização do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão do financiamento do projeto.

Ao Departamento de Zootecnia e Economia Rural da Universidade Federal do Espírito Santo, pela liberação temporária para possibilitar a conclusão das etapas experimentais desta pesquisa.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel, Denise Aparecida Fioravante Garcia, e Maria Regina Tenor Forlin, pelo bom humor e auxílio constante.

Aos professores e novos amigos Paulo Roberto Rodrigues Ramos e Sérgio Luiz Felisbino, que muito me auxiliaram no desenvolvimento do experimento.

Aos professores, Dr. Sebastião Martins Filho, Dr. Carlos Roberto Padovani e Dr. Flávio Ferrari Aragon, pela orientação estatística do trabalho realizado.

Ao amigo Luis Antonio Justulin Junior que, por muitas vezes, abriu mão de seus compromissos para me ensinar e auxiliar.

Aos funcionários da Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, pela revisão das referências bibliográficas.

À funcionária do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Física e Biofísica, Cilene do Carmo F. Padilha, pela extrema paciência e boa vontade sempre demonstrada durante nossa convivência.

Ao colega Alexander Biondo, pelo auxílio na realização das análises laboratoriais na Universidade de Illinois.

Aos amigos José Henrique Azevedo da Silva, Edson Vilela de Melo Filho, Evandro Zacché Pereira e Wangles Pignaton de Paula, pela colaboração na confecção deste trabalho.

Um agradecimento em especial para Ana Carolina Figueiredo Balthazar, pelo incentivo constante e pelo imprescindível apoio para que eu pudesse superar os momentos de dificuldade na minha vida pessoal. Sou muito grato por tudo e espero ser capaz de retribuir todo esse carinho.

“A vida não é um corredor reto e tranqüilo que,  
nós percorremos livres e sem impecilhos,  
mas um labirinto de passagens,  
pelas quais nós devemos procurar nosso caminho,  
perdidos e confusos,  
de vez em quando presos em um beco sem saída.

Porém, se tivermos fé,  
uma porta sempre será aberta para nós,  
não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos,  
mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós”

A. J. Cronin

## LISTA DE FIGURAS

- Trabalho 1 - Figura 1:** Delimitação da região de tecido ósseo a ser realizada a análise densitométrica. \_\_\_\_\_ 41
- Trabalho 2 – Figura 1:** Seleção da região da extremidade distal do rádio de felino com tirotoxicose induzida (esquerda) e mensuração da densidade mineral óssea (direita). \_\_\_\_\_ 55
- Trabalho 2 - Figura 2:** Aumento da atividade da forma ativa da MMP–2 (62kDa, seta) nos momentos 1, 2 e 3 comparada ao momento inicial (M0) em felinos com tirotoxicose induzida. \_\_\_\_\_ 55
- Trabalho 2 – Figura 3:** Análise de regressão dos valores médios de densidade mineral óssea em gatos com tirotoxicose experimental. \_\_\_\_\_ 56
- Trabalho 2 - Figura 4:** Análise de regressão dos valores médios de  $T_4$  livre em gatos com tirotoxicose experimental. \_\_\_\_\_ 56
- Trabalho 2 – Figura 5:** Análise de regressão dos valores médios de  $T_4$  total em gatos com tirotoxicose experimental. \_\_\_\_\_ 57
- Trabalho 2 – Figura 6:** Análise de regressão dos valores médios da forma intermediária MMP –2 em gatos com tirotoxicose experimental. \_\_\_\_\_ 57
- Trabalho 2 – Figura 7:** Análise de regressão dos valores médios da forma ativa da MMP-2 em gatos com tirotoxicose experimental. \_\_\_\_\_ 58
- Trabalho 3 – Figura 1:** Análise de regressão dos valores de FA óssea (reta azul) e hepática (reta preta) em gatos com tirotoxicose induzida. \_\_\_\_\_ 71

**Trabalho 3 – Figura 2:** Gráfico demonstrando a densidade óptica integrada após eletroforese das isoenzimas da fosfatase alcalina de origem hepática (1) e óssea (2) em gatos com tirotoxicose induzida. \_\_\_\_\_71

**Anexo – Figura – 1:** Equipamentos utilizados para dosagem hormonal (RIA). 1- monitor, 2- microcomputador, 3- impressora, 4- contador gama automático. \_\_\_\_\_101

**Anexo – Figura – 2:** Suporte de madeira acoplado à escala de Alumínio ("phantom"). \_\_\_\_\_104

**Anexo – Figura – 3:** Identificação da cicatriz epifisária da extremidade distal do rádio direito (seta). \_\_\_\_\_105

**Anexo – Figura – 4:** Posicionamento do eixo sobre a cicatriz epifisária. \_\_\_\_ 105

**Anexo – Figura – 5:** Marcação de uma reta localizada 5 mm acima da cicatriz epifisária do rádio, sendo referência para a seleção da região a ser feita a densitometria. \_\_\_\_\_106

**Anexo – Figura – 6:** Delimitação da região a ser feita a densitometria. \_\_\_\_ 106

**Anexo – Figura - 7:** Mapeamento das partes moles adjacentes ao tecido ósseo. \_\_\_\_\_107

**Anexo – Figura – 8:** Cálculo da densidade mineral óssea, a partir da região selecionada. \_\_\_\_\_107

**Anexo – Figura – 9:** Suportes para preparação do gel de poliacrilamida para posterior realização de eletroforese de proteínas (Mini Protean II).\_\_\_\_\_ 109

**Anexo – Figura – 10:** Materiais para eletroforese sob condições não-redutoras. Cuba - Mini Protean® (esquerda) e fonte (direita).\_\_\_\_\_ 110

**Anexo – Figura -11:** Microcomputador com o programa computacional Image Master VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech).\_\_\_\_\_ 110

**Anexo – Figura -12:** Zimografia do soro de gatos com tirotoxicose induzida sem incubação com  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$ , demonstrando perda da atividade gelatinolítica das metaloproteinases de matriz -2 e -9.\_\_\_\_\_ 111

**Anexo – Figura -13:** Gel após incubação com  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$  e corados com Comassie Brilliant Blue 0,25%, demonstrando bandas claras indicativas de proteólise em um fundo escuro.\_\_\_\_\_ 111

**Anexo – Figura – 14:** Conversão das imagens obtidas na zimografia em bandas escuras sobre um fundo claro, possibilitando melhor análise densitométrica.\_\_\_\_\_ 112

**Anexo – Figura – 15:** Seleção das linhas e bandas de proteínas obtidas na zimografia para determinação da densidade óptica integrada.\_\_\_\_\_ 112

**Anexo – Figura – 16:** Gráfico demonstrando a densidade óptica integrada das bandas de proteína com atividade gelatinolítica no soro de gato com tirotoxicose induzida. Valores de peso molecular determinados por RF.\_\_\_\_ 113

**Anexo – Figura – 17:** Seleção das linhas e bandas obtidas após eletroforese para caracterização das isoenzimas da fosfatase alcalina em gatos com tirotoxicose induzida. \_\_\_\_\_113

**Anexo – Figura – 18:** Gráfico demonstrando a densidade óptica integrada das bandas de fosfatase alcalina de origem hepática (1) e óssea (2) no soro de gatos com tirotoxicose induzida. \_\_\_\_\_114

**LISTA DE TABELAS**

**Trabalho 1 – Tabela 1:** Medidas descritivas do  $T_3$  total (ng/dl) e resultado do teste estatístico da comparação entre os momentos em gatos submetidos à tirotoxicose experimental (Botucatu, 2006). \_\_\_\_\_ 39

**Trabalho 1 – Tabela 2:** Medidas descritivas do  $T_4$  livre (ng/dl) e resultado do teste estatístico da comparação entre os momentos em gatos submetidos à tirotoxicose experimental (Botucatu, 2006). \_\_\_\_\_ 39

**Trabalho 1 – Tabela 3:** Medidas descritivas do  $T_4$  total ( $\mu$ g/dl) e resultado do teste estatístico da comparação entre os momentos em gatos submetidos à tirotoxicose experimental (Botucatu, 2006). \_\_\_\_\_ 40

**Trabalho 1 – Tabela 4:** Medidas descritivas da densidade mineral óssea (mmAl) e resultado do teste estatístico da comparação entre os momentos em gatos submetidos à tirotoxicose experimental (Botucatu, 2006). \_\_\_\_\_ 40

**Trabalho 1 – Tabela 5:** Medidas de associação entre as variáveis estudadas nos diferentes momentos experimentais em gatos submetidos à tirotoxicose experimental (Botucatu, 2006) \_\_\_\_\_ 41

**Trabalho 2 – Tabela 1:** Valores médios da densidade óptica integrada e desvio padrão das metaloproteinases de matriz em gatos com tirotoxicose induzida, Botucatu 2005. \_\_\_\_\_ 54

**Trabalho 2 – Tabela 2:** Associação entre a densidade mineral óssea e as metaloproteinases de matriz em gatos com tirotoxicose induzida, Botucatu 2005. \_\_\_\_\_ 54

**Trabalho 3 – Tabela 1:** Valores séricos de  $T_4$  livre e  $T_4$  total em gatos avaliados antes (M1) e após tirotoxicose induzida (M2). \_\_\_\_\_ 72

**Trabalho 3 – Tabela 2:** Valores bioquímicos séricos para avaliação do perfil hepático em felinos avaliados antes (M1) e após tirotoxicose induzida (M2). \_72

**Anexo – Tabela 1:** Fórmula utilizada para a preparação do gel de separação para realização de zimografia de proteínas. \_\_\_\_\_ 108

**Anexo – Tabela 2:** Fórmula utilizada para a preparação do gel de separação para realização de eletroforese. \_\_\_\_\_ 108

**Anexo – Tabela 3:** Fórmula utilizada para a preparação do gel de empilhamento para realização de zimografia de proteínas e eletroforese. \_\_109

## LISTA DE ABREVIações

ALT - alanina aminotransferase

APS – persulfato de amônio

AST - aspartato aminotransferase

BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indoilfosfato

DMO – densidade mineral óssea

FA – fosfatase alcalina

GGT - gamaglutamil transferase

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

IOD - densidade óptica integrada

kDa – quilodaltons

kg - quilogramas

kv– quilovolts

M0 – momento zero

M1 – momento um

M2 – momento dois

M3 – momento três

M4 – momento quatro

M5 – momento cinco

M6 – momento seis

mA – miliampère

mAs – miliampères por segundo

mmAL – milímetros de Alumínio

MMP-2 – metaloproteinase de matriz -2

MMP-9 – metaloproteinase de matriz -9

MMPs – metaloproteinases

NBT – nitroblue tetrazolium

pH – potencial de hidrogênio iônico

RF – fator de retenção

sd – desvio padrão

SDS – dodecil sulfato de sódio

## SUMÁRIO

|                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Resumo</b>                                                                                                        | 1   |
| <b>Abstract</b>                                                                                                      | 3   |
| <b>Introdução</b>                                                                                                    | 5   |
| <b>Revisão de Literatura</b>                                                                                         | 9   |
| Tirotoxicose experimental                                                                                            | 10  |
| Efeitos no tecido ósseo                                                                                              | 12  |
| Variações na atividade da fosfatase alcalina                                                                         | 16  |
| Metaloproteinases de matriz -2 e -9                                                                                  | 22  |
| <b>Proposição</b>                                                                                                    | 25  |
| <b>Trabalho 1</b>                                                                                                    | 27  |
| <b>Trabalho 2</b>                                                                                                    | 42  |
| <b>Trabalho 3</b>                                                                                                    | 59  |
| <b>Discussão Geral</b>                                                                                               | 73  |
| <b>Conclusões Gerais</b>                                                                                             | 78  |
| <b>Referências</b>                                                                                                   | 81  |
| <b>Anexos</b>                                                                                                        | 92  |
| Detalhamento do preparo dos animais e da colheita dos materiais biológicos                                           | 93  |
| Metodologia detalhada da realização das dosagens dos hormônios tireoidianos                                          | 95  |
| Metodologia detalhada da realização das análises densitométricas                                                     | 102 |
| Metodologia detalhada da avaliação sérica das metaloproteinases de matriz -2 e -9 e isoenzimas da fosfatase alcalina | 108 |

COSTA, F. S. *Tirotoxicose experimental em gatos: efeitos sobre o tecido ósseo, isoenzimas da fosfatase alcalina e metaloproteinases de matriz -2 e -9*. Botucatu, 2006. 113p. Tese (Doutorado em Radiologia de Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

O hipertiroidismo felino é caracterizado pela presença de excessivas concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos. Para melhor caracterizar os efeitos da tirotoxicose, 16 gatos foram submetidos experimentalmente ao estado hipertiroídico a partir de uma dose de 150µg/kg de levotiroxina sódica a cada 24 horas durante 42 dias. Foram analisados os níveis séricos dos hormônios tireoidianos pela técnica de radioimunoensaio e a densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio direito pela metodologia de densitometria óptica em imagens radiográficas. As metaloproteinases de matriz -2 e -9 foram avaliadas pela técnica de zimografia a partir de amostras séricas de um grupo de cinco animais que apresentaram-se com marcante desmineralização óssea. Adicionalmente, foi analisado o perfil plasmático das enzimas fosfatase alcalina, ALT, AST e GGT, assim como avaliação das isoenzimas de origem óssea e hepática da fosfatase alcalina. Os resultados demonstraram haver uma elevação dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos acompanhada de significativa desmineralização óssea e hiperfosfatemia. As formas ativas das MMPs -2 e -9 apresentaram uma forte correlação negativa com os valores densitométricos da extremidade distal do rádio dos animais. A avaliação da bioquímica sérica revelou marcante hiperfosfatemia e níveis normais das enzimas ALT, AST e GGT entre os momentos avaliados. A eletroforese revelou

maior elevação da isoenzima óssea ao final do protocolo experimental. Conclui-se que a tirotoxicose promovida proporciona desmineralização óssea em felinos domésticos e este evento é acompanhado de um aumento da atividade das metaloproteinases de matriz. A isoenzima originária do tecido ósseo é a principal responsável pela hiperfosfatase promovida.

**Palavras-chave:**

hipertiroidismo, tirotoxicose, densitometria, desmineralização óssea, metaloproteinases de matriz, isoenzimas da fosfatase alcalina

COSTA, F.S. *Experimental thyrotoxicosis in cats: effects in bone tissue, alkaline phosphatases isoenzymes and matrix metalloproteinases -2 and -9*. Botucatu, 2006. 113p. Tese (Doutorado em Radiologia de Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## **ABSTRACT**

Hyperthyroidism is characterized by excessive plasmatic concentrations of thyroid gland hormones. For a better characterization of thyrotoxicosis effects, 16 cats were induced into hyperthyroid state by intaking a dose of 150µg/kg of sodium L-thyroxine every 24 hours during 42 days. The thyroid hormones serum levels were evaluated through radioimmunoassay technique and the bone mineral density of the right distal radius extremity was measured through radiographic optical densitometry technique. The matrix metalloproteinases –2 and –9 were evaluated through gelatin zymography of serum of five animals who presented considerable bone demineralization at densitometric evaluation. In addition, total alkaline phosphatase, bone and hepatic alkaline phosphatases isoenzymes, ALT, AST, and GGT plasmatic profile were evaluated during this experimental period. Results show a raise of serum thyroid hormones associated with significant bone demineralization and hiperphosphatasemia. The active forms of MMPs –2 and –9 demonstrated a strong negative correlation with bone density of right distal radius extremity. The evaluation of serum biochemical show considerable hiperfosfatasemia and normal levels of ALT, AST e GGT during the experiment. Electrophoresis revealed greater elevation of bone isoenzyme at the final of experimental protocol. It was

possible to conclude that thyrotoxicosis induced promoted bone demineralization in domestic cats and this event was associated with an increasing of matrix metalloproteinases activity. Bone isoenzyme is the main responsible for hiperfosfatasemia found in this study.

**Key words:**

hyperthyroidism, thyrotoxicosis, densitometry, bone demineralization, matrix metalloproteinases, alkaline phosphatase isoenzyme

# Introdução

---

## INTRODUÇÃO

O hipertireoidismo felino é uma alteração clínica multissistêmica resultante de excessivas concentrações dos hormônios tireoidianos (tiroxina e triiodotironina). As primeiras descrições da doença em gatos ocorreram no final da década de 70 e início da década de 80 (PETERSON, 1983). Atualmente, de acordo com a literatura norte americana, o hipertireoidismo é considerado como a doença endócrina de maior incidência nos felinos domésticos (THODAY; MOONEY, 1992; MOONEY et al., 1998; MOONEY, 2005), sendo também referida como uma enfermidade comum na prática clínica (MOONEY, 2005).

O aumento do número de casos desta doença nos últimos anos deve-se, provavelmente, a uma maior atenção com relação ao estabelecimento de um diagnóstico preciso de hipertireoidismo. Entretanto, o hipertireoidismo ocorre predominantemente em animais idosos, o aumento da vida média dos gatos observados ultimamente, provavelmente resultou também em um aumento real da afecção na população felina (PETERSON, 1995).

O excesso dos hormônios tireoidianos (tirotóxicose) é caracterizado pela manifestação de sintomas clínicos que podem variar de leves a graves. A gravidade da sintomatologia apresentada irá depender diretamente do estágio em que a doença se encontra e da coexistência de outras alterações sistêmicas, uma vez que na maioria dos casos os pacientes são de meia idade ou idosos (BROUSSARD et al., 1995; PETERSON, 1995).

Alterações correlacionadas aos efeitos decorrentes da excessiva concentração plasmática dos hormônios tireoidianos sobre o tecido ósseo são descritos na espécie humana; porém, poucos são os trabalhos direcionados a estes temas na medicina veterinária.

Em humanos, o hipertireoidismo é considerado um distúrbio endócrino que pode provocar osteoporose, como consequência de um aumento da taxa de reabsorção óssea (AUWERX; BOUILLON, 1986; FINKELSTEIN, 1997). A reposição hormonal em excesso, principalmente em mulheres após a menopausa, pode produzir um estado hipermetabólico semelhante ao identificado na tirotóxicose de origem endógena, podendo proporcionar um

remodelamento ósseo exagerado. Este fato assume destacada importância, uma vez que os hormônios da tireóide estão entre as medicações mais freqüentemente prescritas na medicina humana e a administração de uma dose acima da indicada pode ser ocasionalmente encontrada na prática clínica (FALLON et al., 1983).

Nos animais domésticos, os hormônios tireoidianos também desencadeiam graves efeitos no tecido ósseo, incluindo um aumento na velocidade de formação e reabsorção óssea e alterações nos níveis plasmáticos de cálcio e de fósforo (WASSERMAN, 1988). Em gatos, pode ocorrer uma redução da massa óssea secundária a um estado hipertiroídico, e as sintomatologias clínicas observadas estão associadas a quadros de fraturas patológicas nos ossos longos e nos corpos vertebrais (NEWTON; BIERY, 1992).

Segundo relatos de Seeger (1997), a determinação da densidade mineral óssea é um fator fundamental para a definição de um quadro de osteoporose, servindo também para o estabelecimento de um protocolo terapêutico e o monitoramento dos pacientes acometidos. Cada paciente deve ser avaliado individualmente devido à interferência de fatores como: estilo de vida, características genéticas, uso de medicamentos, tipo de alimentação e ocorrência de distúrbios endócrinos.

Tanto em humanos como em animais, a densitometria assume grande importância para a obtenção de um diagnóstico precoce de desmineralização do tecido ósseo, sendo o seu uso indispensável para a prevenção de fraturas patológicas. Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a determinação da densidade mineral óssea na medicina veterinária, visando proporcionar uma precisão adequada e boas condições de trabalho.

A técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas é considerada útil para a realização de uma análise seqüencial da massa óssea, apresentando uma alta precisão e um custo menor que as demais metodologias (LOUZADA, 1994; GALLO et al., 1996; LOUZADA et al., 1996; LOUZADA et al., 1997; VULCANO et al., 1997; VULCANO et al., 1998; VULCANO, 2001; COSTA, 2002; COSTA et al., 2004). Dessa forma, o uso desta metodologia assume destacada importância na prática clínica para a

determinação da densidade mineral óssea em animais, podendo ser amplamente utilizada na medicina veterinária.

No caso do hipertireoidismo, tanto na espécie humana como em animais, é descrita a ocorrência de alterações no metabolismo ósseo, assim como de lesões hepáticas. Esses processos podem promover um aumento dos níveis séricos da fosfatase alcalina total, sendo um parâmetro indicativo de colestase. A caracterização e a identificação das diferentes isoenzimas fornecem informações clínicas úteis para localizar o tecido que originou seu aumento, podendo auxiliar no direcionamento do diagnóstico e tratamento do paciente (SCHREIBER; SADRO, 1988; TIBI et al., 1989).

O processo de reabsorção óssea decorrente do hipertireoidismo, assim como de outras enfermidades que promovem desmineralização óssea, é mediado diretamente por osteoblastos, entretanto, a degradação da matriz óssea é um processo mediado pela secreção de proteases produzidas pelos osteoblastos. Esses dois processos estão intimamente relacionados e regulados, onde os agentes que modificam a reabsorção óssea frequentemente alteram a degradação do colágeno ósseo por mudanças na atividade das metaloproteinases de matriz e seus inibidores (PATRIDGE et al., 1987; CIVITELLI et al., 1989).

Conforme descrito por Pereira e outros (1999), tanto as collagenases quanto as gelatinases são metaloproteinases secretadas pelos osteoblastos e supostamente desempenham um papel indireto no processo de reabsorção óssea na ocorrência de tirotoxicose.

# Revisão de Literatura

---

## TIROTOXICOSE EXPERIMENTAL

A tirotoxicose é caracterizada pelo excesso de hormônios tireoidianos no organismo dos pacientes, os quais são responsáveis por uma série de manifestações clínicas em diferentes sistemas (PETERSON, 1983). Tanto a produção endógena dos hormônios da tireóide, como a instituição da terapia convencional com levotiroxina, é possível desencadear o aparecimento de sintomas clínicos de hipertireoidismo na espécie humana (FALLON et al., 1983; ADLIN et al., 1991; DIAMOND et al., 1991; MEDEIROS NETO, 1995).

Para uma melhor caracterização e compreensão referente às manifestações clínicas e laboratoriais decorrentes do hipertireoidismo, foram realizados alguns estudos experimentais em animais (LOGAN et al., 1942; ENGFELDT; HJERTQUIST, 1954; ADAMS; JOWSEY, 1966; MUNDY et al., 1976; KUNG; NG, 1994; GOUVEIA et al., 1997; SERAKIDES et al., 2000a, SERAKIDES et al., 2000b; BABINSKI et al., 2001; COSTA, 2002; COSTA et al., 2004).

Logan e outros (1942) realizaram um estudo experimental em filhotes de cães, administrando por via oral um extrato com os hormônios tireoidianos. Com menos de uma semana de tratamento, já foi possível a observação de alterações relacionadas ao metabolismo mineral ósseo, tais como o aumento da excreção urinária de cálcio.

Trabalhando com ratos, Engfeldt e Hjertquist (1954) promoveram tirotoxicose nestes animais, quando notaram o desenvolvimento de hiperfosfatemia. Associadas a esta descoberta laboratorial foram evidenciadas alterações histológicas nas glândulas paratireóides, fato decorrente de uma alta atividade dessas glândulas.

Adams e Jowsey (1966) realizaram um estudo experimental em cães adultos para avaliar o efeito dos hormônios tireoidianos no tecido ósseo e no metabolismo do cálcio e do fósforo. Foram utilizados dois grupos de cães, um grupo com a paratireóide intacta e um outro em que as glândulas foram removidas cirurgicamente. O estado hipertiróidico foi induzido a partir da administração oral de 1,5 mg/kg de levotiroxina sódica diariamente por um período que variou de cinco a 16 semanas. Segundo os autores, os efeitos da

tirotoxicose no tecido ósseo foram evidentes e ocorreram independentemente da presença ou não das glândulas paratireóides.

Realizando um estudo experimental *in vitro* em ossos longos de fetos de ratos, Mundy e outros (1976) demonstraram que um prolongado tratamento com tiroxina e triiodotironina pode proporcionar um aumento direto na intensidade da reabsorção óssea em concentrações hormonais aproximadas às que ocorrem no hipertireoidismo.

No estudo de Kung e Ng (1994), os autores procuraram esclarecer melhor pontos relacionados à fisiopatologia das lesões sobre o tecido ósseo, decorrentes da ação da tiroxina. A tirotoxicose foi estabelecida a partir da administração de levotiroxina na dose de 0,1 a 0,3 µg diariamente em ratos da raça wistar, durante três semanas de tratamento. Após este período experimental, foi possível a observação de significativa diminuição da densidade mineral óssea na coluna, no fêmur e na cauda dos animais, por avaliação densitométrica.

Também trabalhando com ratos, Gouveia e outros (1997) utilizaram fêmeas castradas para indução de tirotoxicose experimental, a partir da administração de levotiroxina. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a administração exógena de doses elevadas de levotiroxina potencializa e agrava a osteopenia decorrente do processo de hipogonadismo.

Serakides e outros (2000a) procuraram avaliar a influência do hipogonadismo sobre a função tireoidiana em 108 ratas castradas da raça wistar, com cinco meses de idade. O hipertireoidismo foi induzido por períodos de 30, 60 e 90 dias mediante a administração diária de 50µg de levotiroxina sódica por animal, utilizando-se para isto uma sonda orogástrica. Os autores concluíram que o hipogonadismo aumenta os valores plasmáticos de T4 livre independentemente do estado funcional da tireóide e potencializa a elevação do T4 total no hipertireoidismo, provavelmente sobre a influência do hipoprogesteronismo e não do hipoestrogenismo.

A indução ao estado hipertiróidico em ratas da raça wistar também foi utilizada para avaliar a relação entre a tireóide, gônadas e o metabolismo ósseo (Serakides et al., 2000b). O hipertireoidismo também foi induzido por períodos de 30, 60 e 90 dias mediante a administração diária de 50µg de

levotiroxina sódica por animal, via uma sonda orogástrica. Concluiu-se que, tanto o hipogonadismo como o hipertireoidismo, foram capazes de alterar o metabolismo ósseo das ratas utilizadas neste experimento.

Para a indução de tirotoxicose em gatos, Babinski e outros (2001) administraram durante 42 dias 150µg/kg de levotiroxina sódica diariamente por via oral em 16 animais adultos, sem distinção de sexo ou raça. Costa e outros (2004), utilizando o mesmo protocolo de indução, verificaram a ocorrência de elevação dos níveis séricos de T4 livre e T4 total em três gatas castradas a partir da primeira semana de administração hormonal.

Lukensmeyer e outros (1970) realizaram um protocolo experimental em oito homens hígidos, tendo como objetivo avaliar possíveis alterações no balanço de cálcio e fósforo. Os pacientes foram submetidos a doses de triiodotironina suficientemente altas para causar evidências clínicas e laboratoriais de um estado hipermetabólico. As dietas do grupo experimental também apresentavam altos níveis de cálcio e fósforo, possibilitando, aos autores, afirmarem que a administração de uma alimentação adequada pode proteger o organismo contra um balanço negativo do cálcio e do fósforo em pacientes.

## **EFEITOS NO TECIDO ÓSSEO**

O termo osteoporose tem sido definido como uma doença caracterizada por uma diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, proporcionando uma maior fragilidade do osso e, consequentemente, elevando os riscos de uma fratura (SEEGER, 1997).

Um excesso ou deficiência dos hormônios tireoidianos afeta o remodelamento ósseo cortical e trabecular (MOSEKILDE et al., 1990). O hipertireoidismo ou uma história prévia da doença é considerado um fator de risco para a osteoporose em humanos e, consequentemente fraturas patológicas podem ocorrer (FOLDES et al., 1993; SCHARLA et al., 1999).

Segundo Meunier (1995), os hormônios tireoidianos causam uma estimulação global do remodelamento ósseo, acelerando a perda óssea

trabecular e, especialmente, cortical. A alteração no remodelamento do tecido ósseo pode ser indicada pela mensuração de marcadores bioquímicos, tais como a osteocalcina sérica, a piridinolina e a hidroxiprolina.

Melsen e Mosekilde (1977) realizaram biopsias da crista ilíaca direita em 40 pacientes humanos portadores de hipertireoidismo. Os achados histopatológicos demonstraram a ocorrência de um aumento da atividade osteoclástica em osso cortical, sendo que este aumento se correlacionava positivamente com os valores séricos de levotiroxina livre e com a excreção urinária de cálcio e fósforo.

De acordo com Allain e Mc Gregor (1992), os achados histológicos do tecido ósseo em pacientes hipertiroídicos têm sido caracterizados por um padrão histomorfométrico com evidência tanto de aumento da atividade osteoblástica como também da atividade osteoclástica. Esses achados podem ser evidenciados no osso cortical e trabecular, entretanto as alterações são mais marcantes no osso cortical.

Mundy e outros (1976) realizaram um estudo *in vitro*, de que foi possível concluir que os hormônios tireoidianos podem estimular diretamente a reabsorção óssea nos ossos longos de fetos de ratos, em concentrações hormonais semelhantes às que verdadeiramente ocorrem na tirotoxicose endógena.

Meema e Schatz (1970) citam que a visualização de manifestações sobre o envolvimento do tecido ósseo em pacientes com tirotoxicose, a partir de radiografias convencionais, é considerada de rara ocorrência. Os estudos com microrradiografias, histologia e densitometria óssea são capazes de demonstrar algum grau de lesão óssea na maioria dos pacientes com hipertireoidismo moderado ou severo.

Estudando radiografias da mão esquerda de 133 pacientes com tirotoxicose, Koutras e outros (1973) observaram que a definição radiográfica de osteoporose nos casos de hipertireoidismo depende fortemente do tempo de duração da enfermidade e da ausência de um tratamento efetivo. A definição da osteoporose simplesmente por critérios radiográficos é de rara ocorrência, sendo que um grau subclínico da doença pode não ser detectado.

Utilizando 23 pacientes hipertiroídicos, Meema e Schatz (1970) procuraram demonstrar a perda óssea nos casos de tirotoxicose a partir da

visualização detalhada da estrutura óssea da mão, com um aumento em oito vezes no tamanho da imagem. Com o uso desta técnica, foi observada uma marcante estriação da cortical do segundo osso metacárpico, o que não se verificou no grupo controle. Existiu uma boa correlação entre a ocorrência de estriações no metacarpo e o decréscimo da densidade mineral óssea do rádio, indicando, assim, que o envolvimento ósseo não estava limitado às mãos.

A densitometria óssea apresenta-se como uma metodologia útil para o estabelecimento de um diagnóstico precoce de diminuição de massa óssea em humanos, sendo capaz de identificar pacientes que apresentem risco de manifestarem fraturas patológicas (SCHARLA et al., 1999).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a determinação da densidade mineral óssea na medicina humana e veterinária. Sua utilidade clínica tem sido descrita tanto para a padronização de valores densitométricos normais, quanto para o diagnóstico de diminuição da massa óssea.

De acordo com Meunier (1995), os estudos densitométricos em humanos com hipertiroidismo demonstram uma redução significativa de moderada amplitude de densidade óssea na coluna lombar e no fêmur dos pacientes; entretanto, a perda óssea mais importante ocorre no tecido ósseo do rádio.

Também em pacientes humanos, Jodar e outros (1997) realizaram um estudo para avaliar o risco de osteoporose em pacientes hipertiroídicos e estabelecer um padrão dos casos controlados terapeuticamente. Os autores observaram que, quando se tinha uma forma ativa da doença ocorria uma redução generalizada da massa óssea no esqueleto axial. O grupo de pacientes hipertiroídicos controlados terapeuticamente demonstrou apenas uma recuperação parcial, que foi insuficiente para normalizar a densidade mineral óssea em todo o esqueleto.

Diversas técnicas para avaliação da densidade mineral óssea têm sido descritas como úteis na medicina veterinária, tais como a absorção direta por fótons (WENTWORTH et al., 1971), análise de ativação por nêutrons (AL HITI et al. 1976), tomografia computadorizada (REICH et al., 1976), fotometria radiográfica (EKMAN et al., 1970), absorção de raios - X de dupla energia (CROVACE et al., 1990; MARKEL; BOGDANSKE, 1994; MUIR et al., 1995) e a densitometria óptica em imagens radiográficas (COSMMAN et al., 1991,

LOUZADA, 1994; GALLO et al., 1996; LOUZADA et al., 1997; VULCANO et al., 1997, VULCANO et al., 1998; VULCANO, 2001; COSTA et al., 2004).

Em um estudo experimental em cães, Adams e Jowsey (1967) avaliaram a densidade mineral óssea em cães sem raça definida induzidos a um estado de tirotoxicose a partir da administração oral de levotiroxina sódica. Os animais foram divididos em dois grupos, um com a glândula paratireóide intacta e outro grupo onde as glândulas foram removidas cirurgicamente. Em ambos os grupos experimentais se verificaram alterações no metabolismo ósseo, observando-se um maior grau de reabsorção do que de formação de tecido ósseo.

Utilizando a técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas, Gallo e outros (1996) avaliaram as diferenças existentes no desenvolvimento ósseo de gatos em fase de crescimento e submetidos a diferentes protocolos de alimentação. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: um recebia ração para filhotes e o outro, ração para adultos. Os autores verificaram que esta técnica permitiu avaliar as diferenças existentes na densidade mineral óssea nos dois grupos experimentais.

Vulcano e outros (1997), realizando estudos densitométricos do carpo ulnar de eqüinos em crescimento da raça quarto de milha, concluíram que a técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas foi de fácil utilização na prática clínica. Outros pontos positivos deste método, segundo os autores, foram os baixos custos do procedimento em comparação com outras técnicas utilizadas para avaliação da densidade mineral óssea, associados a uma alta precisão, sensibilidade e reprodutibilidade.

Utilizando a mesma técnica para a determinação dos valores densitométricos normais nas extremidades distais do rádio em cães da raça rottweiler, Vulcano e outros (1998) realizaram um estudo experimental em 10 cães machos e oito fêmeas com idade entre um e três anos. Foi realizada uma comparação da densidade mineral óssea do terço distal do rádio com a da região de epífise distal do rádio, não se observando diferenças estatisticamente significativas entre as duas regiões avaliadas.

Rahal e outros (2001) empregaram a técnica de densitometria óptica radiográfica para a avaliação do hiperparatireoidismo nutricional. Na pesquisa foram utilizados dez gatos sem raça definida e com idade entre dois e três

meses. O hiperparatireoidismo foi induzido a partir da administração de uma dieta com baixos teores de cálcio, causando um desequilíbrio na relação entre o cálcio e o fósforo com conseqüente aumento da secreção de paratormônio e elevação na taxa de reabsorção óssea. O período experimental foi de 60 dias. No 30º dia já foi possível observar uma queda estatisticamente significativa da densidade mineral óssea das regiões avaliadas, permanecendo em patamares baixos até o término da pesquisa.

## **VARIAÇÕES NA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA**

As fosfatases alcalinas (FA) são consideradas glicoproteínas (MAGNUNSON et al., 2002) e a elevação na sua atividade sérica reflete aumento na síntese e liberação de enzimas em resposta a certos estímulos. Particularmente na espécie felina, pequenos aumentos podem ter relevância clínica significativa, uma vez que a meia-vida sérica da FA felina é menor que a da FA canina (NELSON; COUTO, 2001).

Em indivíduos normais, a fosfatase alcalina sérica é constituída pela contribuição de isoenzimas do fígado, tecido ósseo, placenta e intestino. Os valores enzimáticos no soro podem estar fisiologicamente aumentados nas crianças em fase de crescimento e em mulheres gestantes. Caracteristicamente, a fosfatase alcalina de origem placentária apresenta uma elevação durante o primeiro e o segundo trimestres de gestação, atingindo um pico no terceiro trimestre e retornando aos padrões de normalidade em aproximadamente um mês após o parto (WASSERMAN, 1988).

Níveis elevados da enzima fosfatase alcalina (hiperfosfataseemia) ocorrem freqüentemente em pacientes portadores de alguma doença dos ossos, devido a um aumento da atividade osteoblástica. Entre os exemplos de lesões ósseas descritas tem-se a osteíte deformante, osteomalácia, hiperparatireoidismo, consolidação de fraturas e neoplasias ósseas primárias ou secundárias (WASSERMAN, 1988).

Para a avaliação de alterações no sistema hepatobiliar em gatos pode-se mensurar a fosfatase alcalina total circulante, entretanto deve-se considerar que estas estão associadas à membrana das células hepáticas e estão em baixa concentração no interior dos hepatócitos e do epitélio biliar. As duas enzimas consideradas de grande utilidade diagnóstica em cães e gatos são a alanina-transaminase (ALT) e aspartato-transaminase (AST), pois estão situadas no interior dos hepatócitos e refletem mais precisamente uma lesão hepatobiliar. Normalmente aumentos de duas a três vezes da atividade sérica da ALT estão associadas a lesões hepatocelulares leves, enquanto que valores maiores indicam uma lesão de maior gravidade (NELSON; COUTO, 2001).

Em humanos, uma parcela significativa dos pacientes com tirotoxicose tem demonstrado claramente uma elevação sérica dos níveis circulantes de fosfatase alcalina total, sendo este um achado clínico comum (FISHMAN; GHOSH, 1967; GILLICH et al., 1968; GERLACH et al., 1970; RHONE et al., 1980; SATO et al., 1987).

Segundo Fallon e outros (1983), a tirotoxicose de origem exógena também pode ser responsável por um aumento sérico da fosfatase alcalina em humanos. Os autores relatam os casos de três mulheres que, receberam doses excessivas de reposição hormonal para tratamento de hipotireoidismo, sendo que todas se apresentavam, concomitantemente, com hiperfosfatase.

Rhone e outros (1980) realizaram um levantamento a partir 72 pacientes humanos adultos que apresentavam tirotoxicose. O objetivo dos autores era verificar a ocorrência de hiperfosfatase, assim como determinar e quantificar as isoenzimas da fosfatase alcalina. Os resultados demonstraram que em 89% dos pacientes havia um aumento da fosfatase alcalina total no soro sanguíneo. Quando comparadas com as amostras de soro obtidas do grupo-controle, as amostras dos pacientes hipertiróidicos apresentavam-se com níveis mais altos da isoenzima de origem óssea e, em 68% dos casos, a fosfatase alcalina óssea apresentava-se elevada.

Richter e Ohlen (1971) avaliaram 16 pacientes com hipertireoidismo tendo como objetivo determinar, quantitativamente, o padrão de distribuição das isoenzimas da fosfatase alcalina em humanos. Foi observado um nítido aumento das isoenzimas originárias do tecido ósseo, mas este aumento não se restringiu aos casos em que houve um aumento global da atividade da

fosfatase alcalina, mas, também, em pacientes em que a atividade global da enzima permaneceu dentro dos padrões de normalidade. Com estes resultados, os autores puderam concluir que a elevação da atividade global da fosfatase alcalina em pacientes com tirotoxicose pode ser atribuída, em grande parte, ao aumento dos níveis plasmáticos da isoenzima de origem óssea.

Um aumento dos níveis séricos da fosfatase alcalina total também foi caracterizado em humanos por Bianchi (1970), a partir de um estudo retrospectivo de 180 pacientes. Este fato foi considerado como um dos principais efeitos biológicos nos casos em que havia uma osteopatia decorrente da tirotoxicose.

Leger e outros (1986) descreveram dois casos clínicos de crianças com doença de Graves, apresentando, conseqüentemente, altos níveis circulantes de hormônios tireoidianos. Associado a isto foi observado uma severa desmineralização óssea e hiperfosfataseia. Entretanto, os autores realçam que valores discretamente aumentados da fosfatase alcalina ou no limite superior podem não indicar a ocorrência de uma doença óssea concomitante, mas sim uma alteração normal para a idade.

Serakides e outros (2000b), estudando ratas da raça wistar induzidas a um estado hipertiroídico, verificaram valores de fosfatase alcalina mais elevados nos grupos de ratas fêmeas castradas. Além desta descoberta, foi observada uma correlação positiva entre os valores de estradiol e de progesterona com os níveis enzimáticos da fosfatase alcalina. Sato e outros (1987) também observaram em ratos um estímulo à atividade da fosfatase alcalina em decorrência de um processo de tirotoxicose induzida.

Segundo relatos de Peterson e outros (1983), o aumento da atividade da fosfatase alcalina foi um dos achados mais comumente observado após avaliação laboratorial de 131 gatos com diagnóstico de hipertiroidismo. Nos animais utilizados para este estudo, em torno de 75% apresentavam-se com uma hiperfosfataseia, com um valor médio de  $165,9 \pm 13,2$  UI/l.

Barber e Elliott (1996) avaliaram o perfil bioquímico de 30 gatos com hipertiroidismo não tratado e compararam os resultados com um grupo-controle de 38 gatos normais. Foi verificado um aumento estatisticamente significativo da fosfatase alcalina ( $p < 0,001$ ) nos gatos hipertiroídicos, enquanto 35% dos

animais apresentavam valores acima dos limites máximos estabelecidos para a espécie.

A partir da análise de 34 gatos com hipertireoidismo, Foster e Thoday (2000) observaram uma correlação positiva entre os níveis séricos de levotiroxina e a concentração da fosfatase alcalina. Após avaliação das isoenzimas da fosfatase alcalina pela técnica de eletroforese, observou-se que, em 88% dos gatos, havia presença de bandas correspondentes à atividade das isoenzimas de origem óssea e de origem hepática. Os resultados sugerem que a tirotoxicose em gatos pode desencadear alterações tanto nos ossos como no fígado dos animais com hipertireoidismo.

É descrito que os valores obtidos na avaliação bioquímica sérica da fosfatase alcalina são resultantes do somatório das atividades das isoenzimas derivadas de diferentes tecidos do organismo em indivíduos normais (MOSS, 1982; HORNEY et al., 1992; MAGNUNSON et al., 2002). De acordo com Magnunson e outros (2002), aproximadamente 95% da fosfatase alcalina total é derivada do tecido ósseo e do parênquima hepático em indivíduos normais. Dessa forma, um aumento da atividade da fosfatase alcalina total pode ser decorrente de uma série de enfermidades. Alterações no tecido ósseo, fígado, placenta, rins e intestino estão frequentemente correlacionados com variações dos níveis plasmáticos desta enzima (HOFFMANN et al. 1977; MOSS, 1982; ROSALKI; FOO, 1984; ROSALKI; FOO, 1985; SCHREIBER; SADRO, 1988; ARCHER, TAYLOR, 1996).

No caso do hipertireoidismo, tanto na espécie humana como em animais, é descrita a ocorrência de alterações no metabolismo ósseo, assim como de lesões hepáticas. Feldman e Nelson (1996), realizando análise histológica do parênquima hepático de gatos com tirotoxicose, observaram aumento do pigmento dos hepatócitos, presença de células inflamatórias mistas em região portal e áreas focais de degeneração gordurosa. Entretanto, segundo Klion e outros (1971), uma disfunção hepática é considerada rara na espécie humana e os achados histopatológicos observados são discretos, não específicos e não apresentam correlação com a gravidade da doença.

A caracterização e identificação das diferentes isoenzimas fornecem informações clínicas úteis para localizar o tecido que originou seu aumento, podendo auxiliar no direcionamento do diagnóstico e tratamento do paciente,

tornando-se freqüentemente necessárias na medicina humana (RICHTER; OHLEN, 1971; RHONE et al., 1980; ROSALKI; FOO, 1984; ROSALKI; FOO, 1985; SCHREIBER; SADRO, 1988; TIBI et al., 1989). Esta necessidade também existe na avaliação de gatos com hipertiroidismo endógeno, entretanto, poucos trabalhos citam a realização desta análise nesta espécie (ARCHER; TAYLOR, 1996; FOSTER; THODAY, 2000).

Devido à dificuldade de se separar e quantificar as isoenzimas da fosfatase alcalina, vários métodos tem sido desenvolvidos, sendo as técnicas de eletroforese em gel de acetato de celulose e em gel de poliacrilamida as mais freqüentemente realizadas na rotina laboratorial (SCHREIBER; SADRO, 1988). A utilização de gel de agarose também tem se demonstrado eficaz no desenvolvimento de análises eletroforéticas com o intuito de avaliar a atividade sérica das isoenzimas da fosfatase alcalina (VAN HOOFF et al., 1988; HORNEY et al., 1992; ARCHER; TAYLOR, 1996; BOTTONI et al., 2003). Estudos cromatográficos (cromatografia líquida de alta performance) também permitem a análise destas isoenzimas, além de possibilitar a caracterização de diferentes isoformas de cada isoenzima (MAGNUNSON et al., 2002; DZIEDZIEJKO et al., 2005).

Na espécie humana, um pré-tratamento das amostras séricas com neuraminidase tem se revelado como uma técnica útil para este procedimento, onde esta proteína promove uma maior redução da mobilidade da isoenzima óssea do que da isoenzima hepática durante a eletroforese. Este fato impede que ocorra uma sobreposição das isoenzimas, facilitando a separação no gel e possibilitando uma melhor análise (MOSS; EDWARDS, 1984; SCHREIBER; SADRO, 1988; ARCHER; TAYLOR, 1996; ITOH et al., 2002; BOTTONI et al., 2003). O mecanismo de ação da neuraminidase se dá pela remoção do ácido siálico das isoenzimas, promovendo conseqüentemente um retardo na sua migração anódica durante a eletroforese, com exceção da isoenzima de origem intestinal (ROBINSON; PIERCE, 1964; EVERETT et al., 1977).

Apesar da eficiência comprovada da enzima neuraminidase em humanos, a recomendação de sua utilização na espécie felina é controversa. Horney e outros (1992) citam que a omissão de um pré-tratamento das amostras séricas com neuraminidase promove uma ampliação das bandas de proteínas, tornando difícil a separação. Archer e Taylor (1996) também citam a

importância deste procedimento para promover a separação eletroforéticas das isoenzimas da fosfatase alcalina de origem óssea e de origem hepática. Em contraposição a estes achados, outros autores não recomendam a utilização da neuraminidase em felinos, pois diferentemente da espécie humana, não se observa uma melhora significativa na separação das isoenzimas da fosfatase alcalina nesta espécie (EVERETT et al., 1977; HOFFMANN et al., 1977; FOSTER; THODAY, 2000).

Em gatos normais é possível observar as isoenzimas de origem hepática e óssea a partir de análises eletroforéticas, tanto em felinos adultos quanto em fase de crescimento (HORNEY et al., 1992; ARCHER; TAYLOR, 1996). Entretanto, Nelson e Couto (2001) consideram que em gatos adultos saudáveis, a isoenzima hepática é a principal responsável pelos níveis plasmáticos observados de fosfatase alcalina total, tendo-se uma presença mais significativa da isoenzima óssea em gatos com idade inferior a 15 semanas.

Archer e Taylor (1996) descrevem um significativo aumento da isoenzima de origem óssea em 36 gatos com hipertiroidismo após análise eletroforética, concordando com trabalhos realizados em humanos. Foster e Thoday (2000), a partir da análise de 34 gatos com hipertiroidismo, observaram uma correlação positiva entre os níveis séricos de levotiroxina e a concentração da fosfatase alcalina. Após avaliação das isoenzimas da fosfatase alcalina pela técnica de eletroforese, observou-se que, em 88% dos gatos, havia presença de bandas correspondentes à atividade das isoenzimas de origem óssea e de origem hepática. Os resultados sugerem que a tirotoxicose em gatos pode desencadear alterações tanto no tecido ósseo como no parênquima hepático dos animais com hipertiroidismo.

Para a revelação do gel posteriormente à corrida eletroforética é necessária a utilização de um substrato específico para a fosfatase alcalina, para que seja possível a coloração exclusiva das isoenzimas. A utilização de alfa-naftil fosfato de sódio como substrato pode ser recomendado, entretanto trabalhos recentes recomendam a utilização do composto BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoilfosfato) associado ao NBT (nitroblue tetrazolium) para promover a coloração (HORNEY et al., 1992; THEODOSIOU et al., 1992; ARCHER; TAYLOR, 1996; FOSTER; THODAY, 2000).

## **METALOPROTEINASES DE MATRIZ -2 E -9**

O processo de reabsorção óssea decorrente do hipertireoidismo, assim como de outras enfermidades que promovem desmineralização óssea, é mediado diretamente por osteoclastos, entretanto, a degradação da matriz óssea é um processo mediado pela secreção de proteases produzidas pelos osteoblastos. Esses dois processos estão intimamente relacionados e regulados, onde os agentes que modificam a reabsorção do tecido ósseo freqüentemente alteram a degradação do colágeno ósseo por mudanças na expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (PATRIDGE et al., 1987; CIVITELLI et al., 1989).

Segundo relatos de Hidalgo e Eckman (2001), as MMPs formam uma família de endopeptidases dependentes de metais (principalmente cálcio e zinco), que possuem a capacidade de degradar vários componentes da matriz extracelular. Estas enzimas assumem importante papel em diversos processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento embrionário, a involução uterina após o parto, a ovulação, a erupção dos dentes, a involução da glândula mamária após o período de lactação e a renovação de componentes da matriz extracelular em diferentes tecidos do organismo.

As MMPs são enzimas com características proteolíticas, incluindo as collagenases, gelatinases e estromilinas (MATRISIAN, 1990; MAUVIEL, 1993; FREIJE et al., 1994). As metaloproteinases de matriz -2 e -9 podem ser detectadas caracterizadas em sua forma ativa, intermediária e pró-enzima em amostras do soro ou de tecidos diversos (VISSE; NAGASE, 2003).

Conforme descrito por Pereira e outros (1999), tanto as collagenases quanto as gelatinases são secretadas pelos osteoblastos e têm sido atualmente consideradas como enzimas que desempenham um papel indireto no processo de reabsorção óssea, sendo este fato caracterizado pelos autores em estudo realizado em ratos.

Devido à ação do excesso dos hormônios tireoidianos sobre o metabolismo ósseo, proporcionando um processo de desmineralização, Pereira e outros (1999) consideram que a tirotoxicose pode alterar a degradação do colágeno ósseo e conseqüentemente a atividade da collagenase e da gelatinase. Dessa forma, os hormônios tireoidianos desempenham papel em

regular a atividade destas metaloproteinases nos osteoblastos, interferindo no processo de remodelamento do tecido ósseo.

Além das enfermidades correlacionadas à desmineralização óssea secundária, o estudo das metaloproteinases de matriz -2 e -9 tem sido realizado com o objetivo de melhor compreender a fisiopatologia de algumas neoplasias e avaliar seu potencial metastático em animais domésticos. Entretanto, a avaliação destas enzimas é considerada recente e ainda pouco estudada na medicina veterinária (LOUKOPOULOS et al., 2004; SORENSEN et al., 2004).

Na espécie humana, vários estudos demonstram um aumento na expressão das diferentes metaloproteinases de matriz em situações patológicas diversas, tais como, artrites, encefalites, ulcerações teciduais e em processos de invasão tumoral em neoplasias malignas e disseminação metastática (VISSE; NAGASE, 2003, MOOK et al., 2004, JUSTULIN JUNIOR, 2005).

As MMPs -2 e -9, também denominadas de gelatinase A e B respectivamente, têm sido alvo freqüente de estudos por atuarem na degradação da membrana basal, favorecendo processos de invasão tumoral e metástases. Além deste fato, estas enzimas estão envolvidas em processos de diferenciação celular, apoptose, angiogênese e crescimento de células tumorais, estando diretamente relacionadas ao prognóstico de diferentes processos neoplásicos (MOOK et al., 2004). Em gatos foi comprovado um aumento da atividade destas MMPs em neoplasias (SORENSEN et al., 2004), entretanto, informações sobre o papel destas enzimas nos casos de excesso dos hormônios tireoidianos não foram descritas até o presente momento na literatura consultada.

As MMPs -2 e -9 especificamente, tem sido fortemente associadas ao potencial invasivo e metastático de tumores malignos. Estas enzimas têm a capacidade de degradar elastina, colágeno IV, V, VII, X e XI, assim como componentes menores da matriz extracelular. A ação das MMPs -2 e -9 no colágeno tipo IV é de grande relevância, uma vez que este é o principal constituinte da membrana basal das células (JOHN; TUSZYNSKI, 2001; VISSE; NAGASE, 2003).

A técnica de zimografia em gelatina possibilita uma precisa caracterização da atividade das enzimas metaloproteinases de matriz –2 e -9. Para a realização desta análise, deve-se realizar a eletroforese em gel de poliacrilamida com adição de SDS (dodecil sulfato de sódio), contendo 1mg/ml de gelatina sob condições não redutoras, ocorrendo posterior incubação dos géis em solução contendo cloreto de cálcio e cloreto de zinco (RAWDANOWICZ et al., 1994). Para a visualização da atividade proteolítica das enzimas em aparelhagens específicas e obtenção da densidade óptica integrada de cada banda de proteína, os géis devem ser corados e posteriormente descorados (PEREIRA et al., 1999).

# Proposição

---

## PROPOSIÇÃO

Devido ao aumento do interesse da população de uma maneira geral em adquirir gatos domésticos como animal de estimação, torna-se de grande importância um estudo cada vez maior das enfermidades que atingem esta espécie.

O hipertireoidismo é considerado como a principal doença endócrina em felinos e, em decorrência da carência de trabalhos experimentais relacionados aos efeitos do excesso dos hormônios da tireóide sobre o metabolismo ósseo dos gatos, torna-se importante uma maior investigação científica neste aspecto. Outro ponto relevante se dá com relação à espécie felina servir como modelo experimental para melhor caracterizar as alterações clínicas e laboratoriais do hipertireoidismo na espécie humana.

Objetivou-se neste trabalho induzir gatos normais ao estado de tireotoxicose durante um período experimental de 42 dias. A partir da elevação dos níveis hormonais, pretendeu-se identificar possíveis alterações no metabolismo ósseo, incluindo alterações na densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio direito, níveis séricos da fosfatase alcalina total e suas isoenzimas e atividade das metaloproteinases de matriz -2 e -9.

# Trabalho 1

---

Encaminhado para o periódico Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

ISSN: 1413-9596

Endereço:

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.  
Seção de Publicação.

Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87. Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira.

05508-000 – São Paulo – SP – Brasil

Normas para publicação disponível em:

<http://www.fmvz.usp.br/brazvet>

## **Determinação de desmineralização óssea em gatos após tirotoxicose experimental**

Determination of bone demineralization in cats  
after experimental thyrotoxicosis

Fabiano Séllos COSTA<sup>1</sup>, Mauro José Lahm CARDOSO<sup>2</sup>, Lucy Marie Ribeiro  
MUNIZ<sup>3</sup>, Luiz Carlos VULCANO<sup>3</sup>, Carlos Roberto PADOVANI<sup>4</sup>

Fonte Financiadora: FAPESP

- 1- Departamento de Medicina Veterinária, CCA - UFES, Alegre - ES /  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ –  
UNESP, Campus de Botucatu.
- 2- FFALM – Bandeirantes – PR / Departamento de Reprodução Animal e  
Radiologia Veterinária, FMVZ - UNESP, Campus de Botucatu.
- 3- Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ -  
UNESP, Campus de Botucatu.
- 4- Departamento de Bioestatística, FMVZ - UNESP, Campus de Botucatu.

## Resumo

O hipertireoidismo é capaz de proporcionar efeitos sobre o metabolismo ósseo tanto em humanos como em animais. Para melhor avaliar este fato em gatos, 16 animais foram induzidos a tirotoxicose a partir da administração oral de  $\mu\text{g}$  de levotiroxina sódica a cada 24 horas durante 42 dias. Os níveis hormonais foram avaliados por radioimunoensaio e a densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio direito foi mensurada pela densitometria óptica radiográfica. Foi possível observar, a partir da primeira semana de experimento, significativa elevação sérica de T4 livre e T4 total acompanhada de desmineralização óssea do rádio.

Unitermos: Hipertireoidismo, Tirotoxicose, Gato, Desmineralização óssea

## Summary

Hyperthyroidism can result in serious effects on the bone metabolism in humans as well as animals. For a better characterization of thyrotoxicosis effects, 16 cats were induced into thyrotoxicosis by intaking a dose of  $150\mu\text{g/kg}$  of sodium L-thyroxine every 24 hours during 42 days. The hormonal levels were evaluated by radioimmunoassay technique and the bone mineral density of the right distal radius extremity was measured through the radiographic optical densitometry. Was verified significant bone demineralization seven days of hormonal intake to company of radius demineralization.

Uniterms: Hyperthyroidism, Thyrotoxicosis, Cat, Bone demineralization

## **Determinação de desmineralização óssea em gatos após tirotoxicose induzida**

### **Introdução**

O hipertireoidismo felino é uma alteração clínica multissistêmica resultante das excessivas concentrações dos hormônios tireoidianos (tirotoxicose), sendo atualmente considerado, segundo a literatura norte americana, como o distúrbio endócrino de maior incidência nos felinos domésticos<sup>19</sup>. As alterações clínicas em gatos com esta enfermidade são variáveis e irão depender diretamente do estágio em que a doença se encontra e da coexistência de outras alterações sistêmicas<sup>24</sup>.

Em humanos, o hipertireoidismo é conhecido como um distúrbio capaz de promover osteoporose como consequência do aumento da taxa de reabsorção óssea<sup>6,15</sup>. Desta forma, a ocorrência da doença é considerada como um fator de risco para desmineralização óssea, podendo estar correlacionada com a ocorrência de fraturas patológicas<sup>4,5,6,9,14,16,21,22</sup>.

A desmineralização é decorrente de uma estimulação global do remodelamento do tecido ósseo, acelerando a perda óssea trabecular e cortical<sup>14</sup>. Achados histológicos de tecido ósseo em pacientes humanos com hipertireoidismo têm sido caracterizados com um padrão histomorfométrico onde se evidencia um aumento da atividade osteoblástica e osteoclástica<sup>2</sup>.

Nos animais domésticos, os hormônios tireoidianos são capazes de desencadear graves efeitos sobre o metabolismo ósseo, incluindo um aumento na velocidade de formação e de reabsorção óssea e alterações nos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo<sup>27</sup>. Em felinos, apesar da escassez de informações sobre este ponto, é citado que é possível ocorrer uma perda de massa óssea em decorrência do hipertireoidismo, podendo ocorrer fraturas patológicas nos ossos longos e corpos vertebrais dos animais acometidos<sup>17,27</sup>.

A reposição hormonal excessiva em humanos com hipotireoidismo, principalmente após a menopausa nas mulheres, pode produzir um estado hipermetabólico idêntico ao observado na tirotoxicose endógena, podendo ter

como seqüela um remodelamento ósseo exagerado<sup>4,5,6</sup>. Este fato assume destacada importância, uma vez que os hormônios da tireóide estão entre as medicações mais freqüentemente prescritas na medicina humana e a administração de uma dose exagerada pode ocasionalmente ser encontrada<sup>4</sup>.

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<sup>21</sup>. 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<sup>10,11,12,20,25,26</sup>.

Objetivou-se neste trabalho induzir gatos normais ao estado de tirotoxicose durante um intervalo de tempo e, a partir da elevação dos níveis hormonais, pretendeu-se identificar possíveis alterações na densidade mineral óssea. Em complementação, objetivou-se correlacionar, nos diferentes momentos experimentais, os níveis séricos dos hormônios tireoidianos com os valores densitométricos.

## **Material e Método**

Foram utilizados 16 gatos domésticos (*Felis catus*, L. 1758), adultos, sem distinção de sexo ou raça e sem alterações clínicas ou laboratoriais que pudessem interferir na realização da pesquisa. Animais em fase de crescimento, castrados e fêmeas gestantes foram excluídos do grupo experimental. Após a seleção, os animais foram alojados em um gatil com acesso ao sol, sendo administrada alimentação (ração seca) e água à vontade. Após a realização do experimento, os gatos passaram por um período de desintoxicação de 10 dias, sendo posteriormente doados.

Para indução ao estado de tirotoxicose, administrou-se por via oral comprimidos com 150 µg/kg de levotiroxina sódica a cada 24 horas durante 42 dias. Semanalmente os gatos eram pesados e as doses para cada animal eram reajustadas conforme a necessidade. Todos os dados experimentais foram coletados imediatamente antes do início da administração do medicamento (M0), sendo realizadas posteriormente novas avaliações em seis momentos experimentais, com intervalo de sete dias até o término do período experimental.

As dosagens dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos (T3 total, T4 livre e T4 total) foram obtidas em todos os momentos, pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, utilizando-se conjunto de reagente comercial sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, tendo como elemento radioativo traçador o Iodo<sup>125</sup>.

A avaliação da densidade mineral óssea foi realizada pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas, conforme descrito na literatura<sup>10,11,12,20,25,26</sup>. A área avaliada foi a extremidade distal do rádio direito e, para melhor análise seqüencial dos valores densitométricos, padronizou-se a seleção da região da metáfise localizada 5 mm acima da cicatriz epifisária (Fig.1), sendo essa avaliação realizada em todos os animais e em todos os momentos experimentais.

A análise estatística das variáveis ao longo dos diferentes momentos foi realizada considerando-se a técnica de análise de variância para medidas repetidas. Quando a variável apresentou as características de distribuição normal de probabilidade, o procedimento foi paramétrico. Na ausência de características de distribuição normal de probabilidade utilizou-se o procedimento não-paramétrico. Para a interpretação das letras, deve-se considerar que duas médias ou medianas 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 e Discussão

O protocolo de indução ao hipertireoidismo utilizado foi eficaz, demonstrado por uma elevação estatisticamente significativa dos níveis séricos de  $T_4$  livre (Tab.1) e  $T_4$  total. (Tab.2) Esse aumento esteve presente a partir da primeira semana de administração oral de levotiroxina sódica, mantendo-se os altos níveis hormonais até o término do período experimental de 42 dias. Os níveis plasmáticos de  $T_3$  livre não apresentaram alterações significativas (Tab.3), fato também comumente observado no hipertireoidismo felino<sup>18</sup>. Dessa forma, a dosagem do  $T_3$  livre não esteve associada com as alterações dos níveis de  $T_4$  livre e  $T_4$  total dos gatos ou com as alterações presentes no metabolismo ósseo.

Assim, como nesta pesquisa, outros autores também conseguiram promover uma indução experimental à tirotoxicose a partir da administração oral de levotiroxina sódica<sup>1,8,23</sup>. São descritos trabalhos em ratos<sup>8,23</sup> e cães<sup>1</sup>, em que foi possível a demonstração de alterações do metabolismo do tecido ósseo.

Foi caracterizada uma queda, estatisticamente significativa, da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio dos animais submetidos ao protocolo experimental de indução à tirotoxicose já na primeira semana de tratamento com levotiroxina sódica. Até o término do período experimental ocorreu um gradual decréscimo dos valores médios da densidade mineral óssea (Tab.4). Alterações desta natureza já foram amplamente descritas na medicina humana<sup>1,2,4,5,6,7,9,13,14,15,16,21,22</sup>, entretanto, poucos autores relataram este fato em animais<sup>1,8,17,27</sup>.

Em todos os momentos, a partir do início da administração hormonal, foi observada uma correlação negativa entre a densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio e os níveis plasmáticos de  $T_4$  livre e  $T_4$  total; entretanto, este fato não foi verificado com os níveis de  $T_3$  total. Após duas semanas de tratamento hormonal, foi constatada uma forte correlação negativa entre os níveis de  $T_4$  total e os valores densitométricos (Tab.5).

A partir de radiografias convencionais em humanos, a visualização de manifestações ósseas nos casos de tirotoxicose endógena é de rara

ocorrência<sup>7</sup>. Nesta pesquisa, este acontecimento também foi verificado na tirotoxicose experimental, onde não foi possível estabelecer o diagnóstico de perda de massa óssea nos gatos estudados a partir de radiografias simples. Este fato reforça a importância da avaliação densitométrica para um diagnóstico precoce das lesões ósseas decorrentes do hipertireoidismo.

As semelhanças nas alterações no tecido ósseo na tirotoxicose de origem exógena e endógena em humanos, conforme descrito em mulheres submetidas a uma reposição hormonal excessiva<sup>8</sup>, levam a considerar que fato semelhante possa ocorrer nos gatos domésticos. Dessa forma, possivelmente a perda de massa óssea, observada nos gatos do presente estudo, também ocorrerá de forma semelhante no hipertireoidismo felino de origem endógena. Outro fato relevante, concordando com os relatos de Fallon et al.<sup>4</sup>, é com relação à prescrição de hormônios tireoidianos, já que os resultados da presente pesquisa demonstram que, possíveis erros no cálculo da dose dos medicamentos para reposição hormonal podem proporcionar efeitos no metabolismo ósseo dos gatos.

Kung e Ng<sup>8</sup> demonstram significativa diminuição da densidade mineral óssea do fêmur, da coluna e da cauda de ratos induzidos à tirotoxicose após avaliação densitométrica. As alterações de densidade mineral óssea já estavam presentes com três semanas após o início de administração hormonal, o que concorda com os dados desta pesquisa, segundo os quais, um curto período de tirotoxicose exógena pode afetar o metabolismo ósseo.

A técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas demonstrou ser útil e de fácil realização. Foi possível uma caracterização precisa do quadro de perda de massa óssea, assim como um acompanhamento periódico das alterações da densidade mineral óssea. Outros autores também já verificaram a sua aplicabilidade e precisão em cães<sup>25</sup>, eqüinos<sup>26</sup>, gatos domésticos<sup>20</sup> e em peças ósseas de frangos<sup>12</sup>.

Durante o período experimental, não foram verificadas fraturas patológicas nos animais induzidos ao estado de tirotoxicose. Em humanos, é citado que os efeitos dos hormônios tireoidianos proporcionam uma maior fragilidade do osso, assim, o hipertireoidismo, ou uma história prévia da doença, aumenta o risco de fraturas patológicas decorrentes da osteoporose<sup>5,6,9,21,22</sup>.

Nos gatos utilizados nesta pesquisa, esse fator agravante não ocorreu durante o período experimental.

### Conclusões

O protocolo de indução à tirotoxicose utilizado neste experimento é eficaz e aumenta significativamente os níveis séricos de T4 livre e T4 total nos felinos domésticos a partir da primeira semana de tratamento. Essa elevação dos hormônios tireoidianos foi responsável por uma diminuição estatisticamente significativa da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio direito dos gatos também a partir da primeira semana do período experimental. Apesar da significativa desmineralização óssea, não ocorreram fraturas patológicas. A densitometria óptica em imagens radiográficas é uma metodologia útil, precisa e que proporciona uma adequada avaliação seqüencial da densidade mineral óssea.

### Referências

1. ADAMS, P., JOWSEY, J. Bone and mineral metabolism in hyperthyroidism: an experimental study. **Endocrinology**, v.81, p.735-740, 1966.
2. ALLAIN, T.J., MCGREGOR, A.M. Thyroid hormones and bone. **Journal of Endocrinology**; v.139, p.9-18, 1993.
3. BROUSSARD, J. D., PETERSON, M. E., FOX, P. R. Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.206, n.302, 1995.
4. FALLON M. D., PERRY, H. M., BERGFELD, M., DROKE, D., TEITELBAUM, S. L., AVIOLI, L. V. Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis. **Archives of Internal Medicine**, v. 143, p.442-444, 1983.
5. FOLDES, J., TARJAN, G., SZATHMARI, M., KRASZNAI, I., HORVATH, C. Bone mineral density in patients with endogenous subclinical

- hyperthyroidism: is this thyroid status a risk factor for osteoporosis? **Clinical Endocrinology**, v.39, p.521-527, 1993.
6. JODAR, E., TORRES, M. M., JIMÉNES, F. E., CHARNECO, M. Q., CASTILLO, J. D. L. Bone loss in hyperthyroid patients and in former hyperthyroid patients controlled on medical therapy: influence of etiology and menopause. **Clinical Endocrinology**, v.47, p.279-285, 1997.
  7. KOUTRAS, D. A., PANDOS, P. G., KOUKOULOMMATI, A. S., CONSTANTES, J. Radiological signs of bone loss in hyperthyroidism. **British Journal Radiology**. v.46, p.695-698, 1973.
  8. 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.93-98, 1994.
  9. LÉGER, J., CZERNICHOW, P., GARABÉDIAN, M., BRAUNER, R., RAPPAPORT, R. Ostéopénie grave chez de jeunes enfants atteints d'hyperthyroïdie. **Archives Français Pediatrics.**, v.43, p.123-125, 1986.
  10. 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.
  11. 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**.
  12. LOUZADA, M. J. Q., PELÁ, C. A., BELANGERO, W. D., SANTOS-PINTO, R. Densidade de peças ósseas de frangos. Estudo pela densitometria óptica radiográfica. **Veterinária e Zootecnia**, v.9, p.95-109, 1997.
  13. MELSEN, F., MOSEKILDE, L. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hyperthyroidism. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v.85, n.141, 1977.
  14. MEUNIER, P. J. Hyperthyroidies et ostéoporose. **Annales d'Endocrinologie**, v.56, p.57-59, 1995.
  15. 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.

16. MUNDY, G. R., SHAPIRO, J. L., BANDELIN, J. G., CANALIS, E. M. RAISZ, L. G. Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. **Journal of Clinical Investigation**, v.58, p.529-534, 1976.
17. NEWTON, C. D., BIERY, D. N. Moléstias esqueléticas. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1992, v.4, p.2494-2517.
18. PETERSON, M. E. Hyperthyroid diseases. In: ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995, p.1466-501.
19. 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.183, n.1, p.103-110, 1983.
20. RAHAL, S. C., MORTARI, A. C., CAPORALI, E. H. G., VULCANO, L. C., SANTOS, F. A. M., TAKAHIRA, R. K. Emprego da densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA FELINA, 2001, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro, 2001, p. 35.
21. SCHARLA, S. H., WOLF, S., DÜLL, R., LEMPERT, U. G. Prevalence of low bone mass and endocrine disorders in hip fracture patients in Sourthern Germany. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v.107, p.547-554, 1999.
22. SEEGER, L. L. Bone density determination. **Spine**, v.22, n.245, 49s-57s, 1997.
23. 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. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n.6, p.579-585, 2000.
24. THODAY, K. L.; MOONEY, C. T. Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. **Veterinary Records**, v.131, p.257-264.

25. 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**.
26. VULCANO, L. C. **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, 2001. 52p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
27. WASSERMAN, R.H. Ossos In: SWENSON, M..J. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10 ed., 1988, p.413-427.



Medidas descritivas do T<sub>4</sub> total (µg/dl) e resultado do teste estatístico da comparação entre os momentos em gatos submetidos à tirotoxicose experimental (Botucatu, 2006).

**Tabela 4**  
Medidas descritivas da densidade mineral óssea (mmAl) e resultado do teste estatístico da comparação entre os momentos em gatos submetidos à tirotoxicose experimental (Botucatu, 2006).

Medidas descritivas da densidade mineral óssea (mmAl) e resultado do teste estatístico da comparação entre os momentos em gatos submetidos à tirotoxicose experimental (Botucatu, 2006).

[illegible]

Tabela 5

Medidas de associação entre as variáveis estudadas nos diferentes momentos experimentais em gatos submetidos à tirotoxicose experimental (Botucatu, 2006).

| Associação<br>entre variáveis | M0    | M1    | M2     | M3    | M4    | M5    | M6    |
|-------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| DMO x T3 total                | -0,30 | 0,23  | -0,06  | -0,07 | -0,10 | -0,20 | -0,14 |
| DMO x T4 livre                | -0,26 | -0,15 | -0,15  | -0,15 | -0,12 | -0,27 | -0,36 |
| DMO x T4 total                | -0,24 | -0,27 | -0,51* | -0,24 | -0,08 | -0,19 | -0,37 |

\*P<0,05 / DMO – Densidade mineral óssea

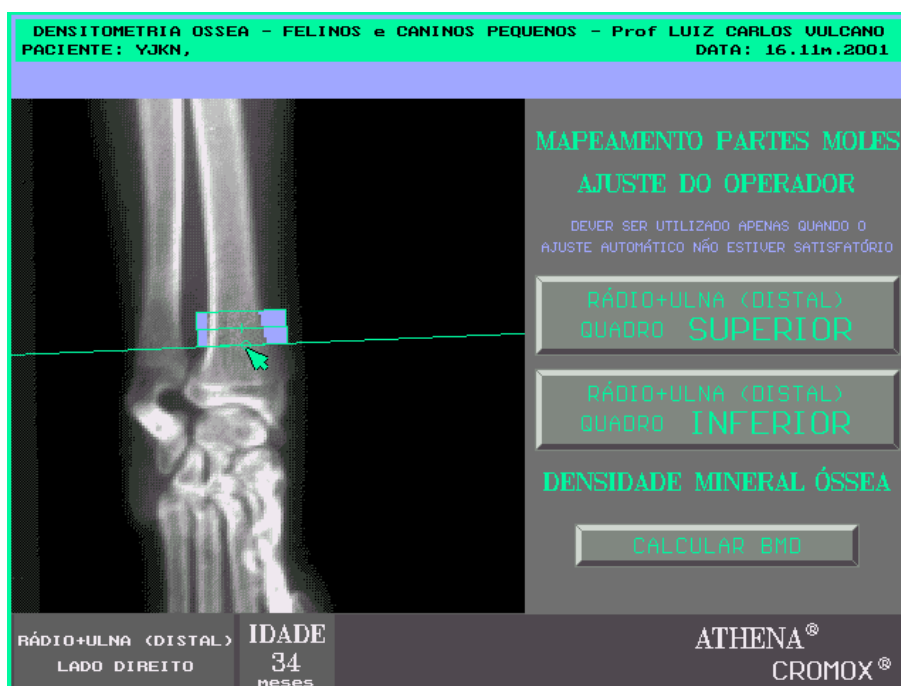


Figura 1 - Delimitação da região de tecido ósseo a ser realizada a análise densitométrica.

# Trabalho 2

---

A ser encaminhado para o periódico Journal of Veterinary Internal Medicine

ISSN: 0891-6640

Endereço:

1997 Wodsworth Blvd, Suite A, Lakewood, CO.

80214-5293

United States of America

Normas para publicação disponível em:

<http://www.jvmi.allentrack.net/>.

## **Avaliação das metaloproteínases de matriz –2 e –9 em gatos com desmineralização óssea secundária à tirotoxicose induzida**

Evaluation of matrix metalloproteinases –2 and –9 in cats with bone demineralization secondary induced thyrotoxicosis

Fabiano Séllos COSTA<sup>1</sup>, Mauro José Lahm CARDOSO<sup>2</sup>,  
Lucy Marie Ribeiro MUNIZ<sup>3</sup>, Luiz Carlos VULCANO<sup>3</sup>,  
Luís Antonio JUSTULIN JÚNIOR<sup>4</sup>; Sérgio Luís FELISBINO<sup>5</sup>  
Sebastião MARTINS FILHO<sup>6</sup>

Fonte Financiadora: FAPESP

1. Departamento de Medicina Veterinária, CCA - UFES, Alegre - ES / Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu.
2. FFALM – Bandeirantes – PR / Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - UNESP, Campus de Botucatu.
3. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - UNESP, Campus de Botucatu.
4. Departamento de Biologia Celular. Instituto de Biologia, UNICAMP.
5. Departamento de Morfologia. Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu.
6. Departamento de Engenharia Rural, CCA – UFES, Alegre - ES

## Resumo

A tirotoxicose é caracterizada pelas excessivas concentrações séricas dos hormônios tireoidianos, podendo desencadear graves alterações no metabolismo ósseo. Processos de desmineralização óssea podem promover aumento da atividade das metaloproteinases de matriz –2 e –9, entretanto este fato não é descrito no hipertireoidismo felino. O presente trabalho demonstra ocorrência de significativo aumento de atividade das formas ativas das metaloproteinases –2 e –9 em gatos com tirotoxicose induzida e desmineralização óssea. Os resultados sugerem um aumento da degradação da matriz colágena secundária à elevação dos hormônios tireoidianos.

**Palavras-chave:** hipertireoidismo, tirotoxicose, desmineralização óssea, metaloproteinase de matriz, gato.

## Abstract

Thyrotoxicosis is characterized by excessive concentrations of thyroid hormones in serum, and can result in serious effects in bone metabolism. Bone demineralization can promote high activity of matrix metalloproteinases –2 and –9, but this fact isn't reported in feline hyperthyroidism. The present paper show the occurrence of significant increase activity of active forms of matrix metalloproteinases –2 and -9 in cats with induced thyrotoxicosis and bone demineralization. The results suggest a increase of collagen matrix degradation secondary at high levels of thyroid hormones.

**Key words:** hyperthyroidism, thyrotoxicosis, bone demineralization, matrix metalloproteinases, cat.

## **Avaliação das metaloproteinases de matriz –2 e –9 em gatos com desmineralização óssea secundária à tirotoxicose induzida**

### **Introdução:**

O hipertiroidismo felino é uma alteração clínica multissistêmica resultante das excessivas concentrações dos hormônios tireoidianos, sendo atualmente considerado o distúrbio endócrino de maior incidência nos felinos domésticos (Peterson et al 1983, Thoday et al 1992, Broussard et al 1995). Alterações no metabolismo ósseo em gatos com tirotoxicose podem ser caracterizadas, tais como desmineralização óssea, hipercalcemia, hiperfosfatemia (Peterson et al 1983), diminuição do paratormônio circulante e aumento da fosfatase alcalina de origem óssea (Archer e Taylor, 1996, Foster e Thoday 2000) e níveis de osteocalcina (Archer e Taylor, 1996).

Em humanos, as alterações sobre o metabolismo ósseo também são amplamente descritas nos casos de tirotoxicose (Mosekilde et al. 1990). A caracterização e tratamento precoce dos efeitos dos hormônios tireoidianos sobre o tecido ósseo assumem grande importância e previnem a ocorrência de fraturas patológicas (Jodar et al 1997). A reposição hormonal em excesso em pacientes com hipotiroidismo, principalmente em mulheres após a menopausa, pode produzir um estado hipermetabólico idêntico ao observado na tirotoxicose endógena, também promovendo um remodelamento ósseo exagerado (Fallon et al 1983, Jodar et al 1997).

Estudos experimentais com indução a um estado de tirotoxicose foram desenvolvidos em humanos (Lukensmeyer et al. 1970), cães (Adams 1966), e ratos (Kung e Ng, 1994, Pereira et al. 1999, Serakides et al. 2000) nos quais também foi possível demonstrar alterações no metabolismo ósseo, assim como ocorre no hipertiroidismo endógeno.

O processo de reabsorção óssea é mediado diretamente por osteoclastos, entretanto, a degradação da matriz óssea é mediada pela

secreção de proteases produzidas pelos osteoblastos. Esses dois processos estão intimamente relacionados e regulados, onde os agentes que modificam a reabsorção do tecido ósseo freqüentemente alteram a degradação do colágeno ósseo por mudanças na expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (Pereira et al.1999).

As metaloproteinases de matriz formam uma família de endopeptidases dependentes de metais e atuam no remodelamento da matriz extracelular. As MMPs –2 e –9, também denominadas como Gelatinase A e B respectivamente, são secretadas pelos osteoblastos e tem a capacidade de degradar elastina, colágeno IV, V, VII, X e XI, assim como componentes menores da matriz extracelular (Matrisian, 1990).

Agentes que sabidamente aumentam a reabsorção óssea, promovem uma maior síntese das MMPs –2 e –9 pelos osteoblastos (Lorenzo et al. 1992, Kusano et al. 1998, Guo et al. 2005). Em ratos, os hormônios tireoidianos em excesso proporcionaram um aumento na expressão das MMPs –2 e –9, sendo este fato possivelmente associado à degradação da matriz colágena e ocorrência de osteopenia (Pereira et al. 1999).

As MMPs –2 e –9 têm sido alvo freqüente de estudos por atuarem na degradação da membrana basal, favorecendo processos de invasão tumoral e metástases (Kugler, 1999, Mook et al. 2004). Além disto, estas enzimas estão envolvidas em processos de diferenciação celular, apoptose e angiogênese, estando diretamente envolvidas no prognóstico de diferentes processos neoplásicos (Mook et al 2004). Nas espécies canina (Loukopoulos, 2003) e felina (Jankowski et al, 2002, Sorensen et al., 2004) foi comprovado um aumento da atividade destas metaloproteinases de matriz em processos neoplásicos de caráter maligno, entretanto, informações sobre o papel destas enzimas nos casos de excesso dos hormônios tireoidianos nestas espécies não foram descritas até o momento.

No presente estudo foi avaliada a atividade das MMPs –2 e –9 em gatos domésticos induzidos à tirotoxicose experimental e que apresentaram desmineralização óssea concomitante, com o objetivo de avaliar o papel destas enzimas no processo de remodelamento da matriz colágena.

## Materiais e Métodos

Foram utilizados cinco gatos domésticos (*Felis catus*, L. 1758), adultos, sem distinção de sexo ou raça e sem alterações clínicas ou laboratoriais que pudessem interferir na realização da pesquisa. Animais em fase de crescimento, castrados e fêmeas gestantes foram excluídos do grupo experimental. Após a seleção, os animais foram alojados em um gatil com acesso ao sol, sendo administrada alimentação (ração seca) e água à vontade. Após a realização do experimento, os gatos passaram por um período de desintoxicação de 10 dias, sendo posteriormente doados.

Para indução ao estado de tirotoxicose, administrou-se por via oral, comprimidos com 150 µg de levotiroxina sódica a cada 24 horas durante 42 dias. Semanalmente os gatos eram pesados e as doses para cada animal eram reajustadas conforme a necessidade. Todos os dados experimentais foram colhidos imediatamente antes do início da administração do medicamento (M0), sendo realizadas posteriormente novas avaliações das variáveis a cada quatorze dias, até o término do período experimental (M3).

A dosagem dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos (T3 total, T4 livre e T4 total) foram obtidas em todos os momentos, pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, utilizando-se conjunto de reagente comercial sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, tendo como elemento radioativo traçador o Iodo<sup>125</sup>.

A avaliação da densidade mineral óssea foi realizada pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas, conforme previamente descrito na literatura (Vulcano et al. 1998; Rahal et al, 2001, Vulcano 2001). A área avaliada foi a extremidade distal do rádio direito e, para melhor análise seqüencial dos valores densitométricos, padronizou-se a seleção da região da metáfise localizada 5 mm acima da cicatriz epifisária em todos os animais e em todos os momentos experimentais, sendo posteriormente feita o cálculo da densidade mineral óssea (Fig.1).

Para a realização da zimografia de proteínas, alíquotas com 1µl de soro foram submetidas à eletroforese sob condições não redutoras (100 V a 4°C)

em gel de poliacrilamida a 8%, contendo 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, os géis foram lavados em Triton X-100 2,5%, duas vezes por 15 minutos. Posteriormente, os géis foram novamente lavados duas vezes com o tampão Tris-HCl 50Mm pH 8,4 por de cinco minutos, sendo em seguida incubados por 14 horas a 37°C no mesmo tampão contendo 5 Mm de Cloreto de Cálcio e 1µM de Cloreto de Zinco. Após a incubação, os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue 0,25%, possibilitando a visualização da atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9.

As bandas de proteínas obtidas na zimografia foram digitalizadas, convertidas em bandas escuras sobre um fundo claro e analisadas por densitometria. A atividade gelatinolítica das bandas das metaloproteinases -2 e -9 foi analisada obtendo-se a densidade óptica integrada (IOD), utilizando-se o programa computacional Image Master VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

Para a análise estatística das variáveis estudadas durante o período experimental, utilizou-se o teste de regressão. A associação entre as variáveis nos diferentes momentos foi realizada por testes de correlação linear de Pearson, sendo considerados significativos os valores com probabilidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados:**

O protocolo utilizado para a indução ao hipertireoidismo foi eficaz, ocorrendo por uma elevação estatisticamente significativa dos níveis séricos de T<sub>4</sub> livre e T<sub>4</sub> total. Esse aumento foi detectado já no primeiro momento avaliado após o início da administração exógena de levotiroxina sódica, mantendo-se os altos níveis hormonais até o término do período experimental (Figuras 4 e 5). Foi caracterizada uma queda dos valores séricos de T<sub>4</sub> livre aos 42 dias de tratamento, porém acima dos valores observados no momento inicial (Figura 4). Os níveis séricos de T<sub>3</sub> total não apresentaram variação significativa durante o período experimental.

Associada à tirotoxicose promovida, foi caracterizada uma queda da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio direito dos animais nos demais momentos após o início da administração hormonal de levotiroxina sódica (Figura 3).

Testes para padronização da técnica de zimografia em gelatina foram realizados, sendo utilizada para avaliação uma alíquota de 1µl das amostras séricas e um período de incubação de 14 horas. Esta metodologia demonstrou ser eficaz para a demonstração das formas pró, intermediária e ativa da MMP-2 (75kDa, 66kDa e 62kDa respectivamente) e da forma ativa da MMP-9 (83kDa), sem provocar saturação de nenhuma banda.

A forma ativa da MMP -2 apresentou uma tendência de elevação após o início da administração hormonal e este fato perdurou até o final do protocolo experimental (Figura 6). As formas pró e intermediária da MMP-2 apresentaram-se elevadas com 14 dias de tratamento quando comparadas ao momento inicial, porém posteriormente houve uma tendência de queda (Tabela 1).

Conforme demonstrado na tabela 2, a forma ativa das MMPs -2 e -9 apresentaram uma expressiva correlação negativa com os valores da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio dos gatos no primeiro momento experimental ( $p < 0,05$ ), com 14 dias de administração hormonal.

Anteriormente à administração hormonal, era presente uma fraca correlação negativa entre os níveis séricos da forma intermediária da MMP -2 e os resultados densitométricos. Posteriormente, nos demais momentos experimentais, passaram a ser observada uma correlação positiva entre essas variáveis, sendo esta de significância estatística ( $p < 0,01$ ) aos 42 dias de experimento (Tabela 2).

## **Discussão:**

Como nesta pesquisa, outros autores conseguiram promover uma indução experimental à tirotoxicose a partir da administração oral de levotiroxina sódica. São descritos trabalhos em ratos (Kung e Ng, 1994, Pereira

et al. 1999, Serakides et al 2000) e cães (Adams 1966), nos quais também foi possível a demonstração de alterações do metabolismo ósseo. Os maiores valores médios dos níveis séricos de T4 livre foram observados nos momentos com 14 e 28 dias após início da suplementação de levotiroxina sódica, havendo um decréscimo no último momento avaliado. Uma inibição da produção endógena é observada após início da suplementação hormonal em humanos, fato este também caracterizado nos gatos utilizados deste experimento, uma vez que a dose administrada foi sempre constante. Os valores de T4 total permaneceram elevados e em patamares constantes durante todos os momentos avaliados posteriormente ao início do tratamento hormonal. A discreta alteração observada nos níveis séricos de T3 total, também podem, segundo Thoday e Mooney (1992), estar presentes com frequência no hipertiroidismo felino de origem endógena.

A técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas demonstrou ser útil e de fácil realização, conforme já previamente relatado em cães (Vulcano et al 1998), gatos (Rahal et al 2001) e cavalos (Vulcano 2001). Foi possível uma observação precisa do quadro de perda de massa óssea, assim como um acompanhamento periódico das alterações da densidade mineral óssea ao longo do experimento.

As semelhanças nas alterações no tecido ósseo na tirotoxicose de origem exógena e endógena em humanos, conforme descrito por Fallon et al (1983), em mulheres submetidas a uma reposição hormonal excessiva, levam a considerar que fato semelhante ocorra nos gatos domésticos. Dessa forma, possivelmente a desmineralização óssea e a maior ativação das MMPs -2 e -9, observadas nos animais do presente estudo, também ocorrerão de forma semelhante no hipertiroidismo felino de origem endógena.

Os resultados observados, concordando com os relatos de Pereira et al (1998) após estudo em ratos, sugerem o envolvimento das metaloproteinases - 2 e -9 no processo de desmineralização óssea também na espécie felina. Os gatos com tirotoxicose induzida apresentaram maior atividade das MMPs -2 e -9, estando este achado possivelmente correlacionado à promoção de uma maior degradação da matriz colágena do tecido ósseo.

Uma forte correlação negativa foi verificada entre as formas ativas das MMPs -2 e -9 e a densidade mineral óssea com 14 dias de administração

hormonal, momento em que também se observou uma maior amplitude de desmineralização do tecido ósseo. Tal fato demonstra a rápida ação destas MMPs na ocorrência de tirotoxicose, sendo um fator agravante nos processos de osteoporose secundária em pacientes com hipertireoidismo, conforme já descrito em ratos (Pereira et al 1998).

A forma intermediária da MMP -2, em um primeiro momento, apresentou-se elevada, entretanto, com 42 dias de indução ao estado de tirotoxicose caracterizaram-se os menores valores médios deste precursor, observando-se também uma correlação positiva com os valores densitométricos. Tal fato justifica-se pela elevação significativa da forma ativa desta enzima durante todo o período experimental, promovendo uma alta taxa de conversão da forma intermediária.

Pode-se concluir que a desmineralização óssea secundária à tirotoxicose promoveu aumento da atividade das MMPs -2 e -9 em gatos. Além do importante papel destas enzimas em diferentes processos neoplásicos, conforme previamente descrito na medicina veterinária (Jankowski et al, 2002, Loukopoulos, 2003; Sorensen et al., 2004), vale também ressaltar a importância da avaliação do papel das metaloproteinases de matriz -2 e -9 em diferentes processos que promovam desmineralização óssea, entre estas o hipertireoidismo, para melhor esclarecimento dos aspectos fisiopatológicos desta enfermidade na espécie felina.

## **Referências:**

1. Pereira RC, Jorgetti v, Canalis, E. Triiodothyronine induces collagenase-3 and gelatinase B expression in murine osteoblasts. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 1999, 277: E496-E504.
2. Kusano K, Miyaura C, Inada M et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9 and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998; 139: 1338-1345.

3. Lorenzo JÁ, Pilbean CC, Kalinowsk JF, Hibbs MS. Production of both 92 and 72 kDa gelatinases by bone cells. *Matrix* 1992, 12: 282-290.
4. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1705: 69-89.
5. Serakides R, Nunes, VA, Nascimento EF, et al. Relação tireóide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2000, 52: 579-585.
6. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trend Genet* 1990, 6: 121-125.
7. Kugler A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Research* 1999, 19: 1589-1592.
8. Jodar E, Torres MM, Jimenes FE, et al. Bone loss in hyperthyroid patients and in former hyperthyroid patients controlled on medical therapy: influence of etiology and menopause. *Clinical Endocrinology* 1997, 47: 279-285.
9. Broussard JD, Peterson ME, Fox PR. Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1995, 206: 302.
10. Thoday KL; Mooney CT. Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. *Veterinary Records* 1992, 131: 257-64.
11. Peterson ME, Kintzer PP, Cavanagh PG, et al. Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1983, 183: 103-110.
12. Loukopoulos R, Mungall RC, Straw RC, Thornton JR, Robinson WF. Matrix metalloproteinase -2 and -9 involvement in canine tumors. *Veterinary Pathology* 2003, 40: 382-394.
13. Kung AW, Ng F. A rat model of thyroid hormone-induced bone loss: effect of antiresorptive agents on regional bone density and osteocalcin gene expression. *Thyroid* 1994, 4: 93-98.
14. Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1990, 19: 35-63.

15. Lukensmeyer WW, Hege JH, Theil GB, Wilson WR Calcium and phosphorus metabolic studies in triiodothyronine-induced hypermetabolism. *The American Journal of the Medical Science* 1970, 259: 282-291.
16. Adams P, Jowsey J. Bone and mineral metabolism in hyperthyroidism: an experimental study. *Endocrinology* 1966, 81: 735-740.
17. Guo LG, Luo XH, Wu XP, Xie H, Zhou HD, Zhang, H, Cao XZ, Liao EY. Relationships between circulating matrix metalloproteinases –1 and –2 and metalloproteinase –1 levels and bone biochemical markers and bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005, 85 (11): 734-737.
18. Jankowski MK, Ogilvie GK, Lana SE, Feetman MJ, Hansen RA, Powers BE, Mitchener KM, Lovett SD, Richardson KL, Persley L, Walton JÁ. Matrix metalloproteinase activity in tumor, stromal tissue, and serum from cats with malignancies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002, 16: 105-108.
19. Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, Thomtom JR, Robinson WF. Matrix metalloproteinase –2 and –9 involvement in canine tumors. *Veterinary Pathology* 2003, 40: 382-394.
20. Fallon MD, Perry HM, Bergfeld M. Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis. *Archives of Internal Medicine* 1983, 143: 442-444.
21. Sorensen KC, Kitchell BE, Schaeffer DJ, Madris PE. Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas. *American Journal Veterinary Research* 2004, 65: 373-379.
22. Foster DJ, Thoday KL. Tissue sources of serum alkaline phosphatase in 34 hyperthyroid cats: a qualitative and quantitative study. *Research in Veterinary Science* 2000, 68: 89-94.
23. Archer FJ, Taylor SM. Alkaline phosphatase bone isoenzyme and osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. *Canadian Veterinary Journal* 1986, 37: 735-739.
24. Vulcano LC, Leal ACR, Louzada MJQ, Muniz LMR, Mamprim MJ. 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.

25. Vulcano LC 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, 2001. 52p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
28. Rahal SC, Mortari AC, Caporali EHG, Vulcano LC, Santos FAM, Takahira RK. Emprego da densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA FELINA, 2001, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro, 2001, p. 35.

Tabela 1 - Valores médios da densidade óptica integrada e desvio padrão das metaloproteinases de matriz em gatos com tirotoxicose induzida, Botucatu 2006.

| Variáveis                            | Início do<br>tratamento | 14 dias     | 28 dias     | 42 dias     |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
| MMP –2 75kDa<br>Forma pró-enzima     | 7471±3341               | 14432±9219  | 8214±9566   | 12075±8329  |
| MMP –2 66 kDa<br>Forma intermediária | 20655±9373              | 24974±11169 | 24467±8151  | 11386±10813 |
| MMP –2 62 kDa<br>Forma ativa         | 75369±18988             | 83583±24851 | 85930±30928 | 99240±20437 |
| MMP –9 83 kDa<br>Forma ativa         | 2818±1260               | 7159±3524   | 4951±2464   | 5118±3363   |

MMP – Metaloproteinases de Matriz;

Tabela 2- Associação entre a densidade mineral óssea e as metaloproteinases de matriz em gatos com tirotoxicose induzida, Botucatu 2006.

| Associação entre<br>as variáveis | Início do<br>tratamento | 14 dias | 28 dias | 42 dias |
|----------------------------------|-------------------------|---------|---------|---------|
| DMO x MMP–2 75kDa                | -0,45                   | -0,42   | -0,39   | 0,28    |
| DMO x MMP–2 66kDa                | -0,17                   | 0,28    | 0,51    | 0,93**  |
| DMO x MMP–2 62kDa                | -0,37                   | -0,98** | -0,63   | -0,06   |
| DMO x MMP–9 83kDa                | -0,19                   | -0,91*  | -0,15   | 0,01    |

\*P<0,05; \*\*P<0,01

DMO – Densidade Mineral Óssea; MMP – Metaloproteinases de Matriz;

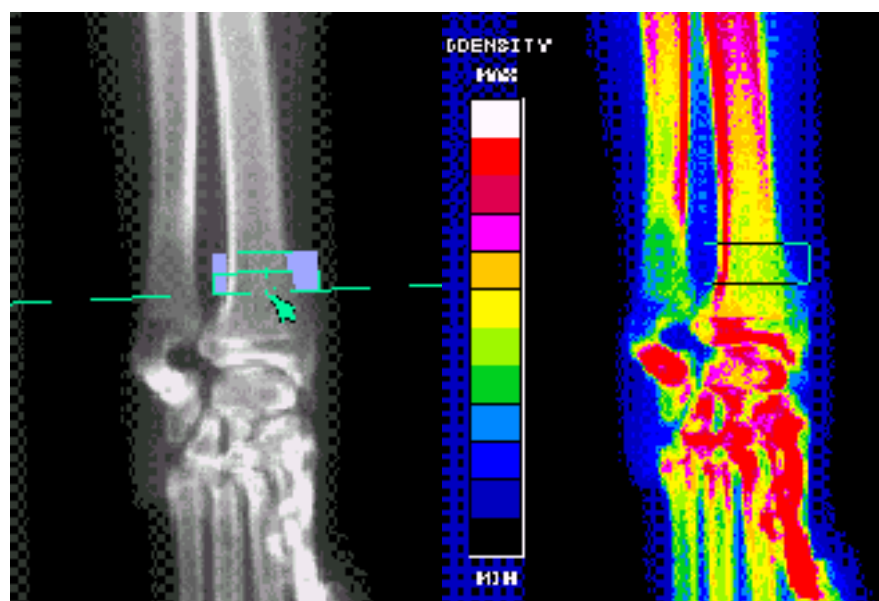


Figura 1 – Seleção da região da extremidade distal do rádio de felino com tirotoxicose induzida (esquerda) e mensuração da densidade mineral óssea (direita).

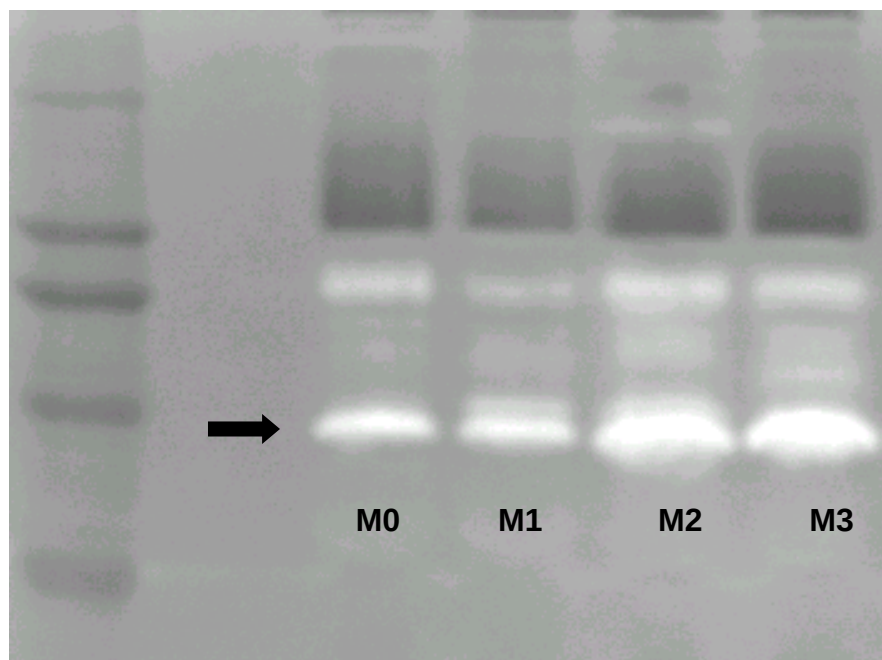


Figura 2 – Aumento da atividade da forma ativa da MMP-2 (62kDa, seta) nos momentos 1, 2 e 3 comparado ao momento inicial (M0) em felinos com tirotoxicose induzida

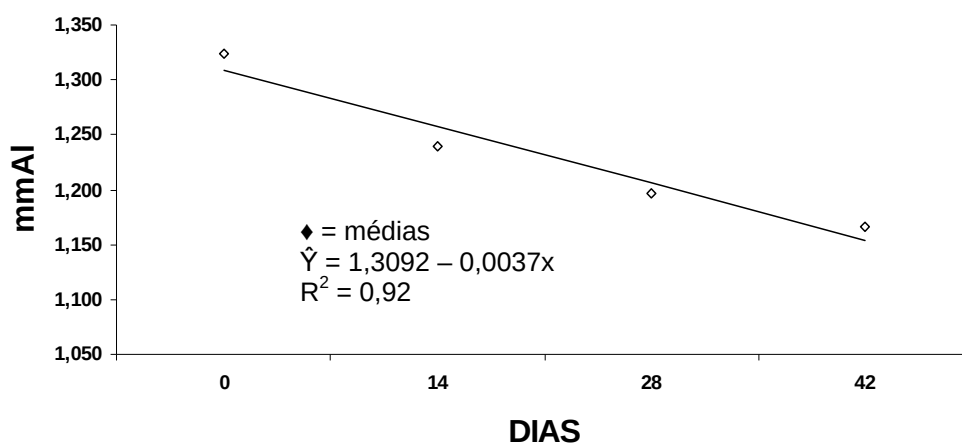


Figura 3- Análise de regressão dos valores médios de densidade mineral óssea em gatos com tirotoxicose experimental.

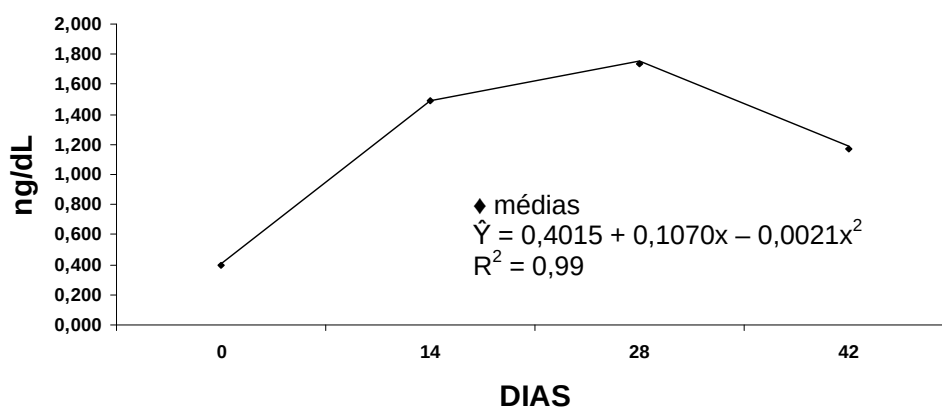


Figura 4- Análise de regressão dos valores médios de  $T_4$  livre em gatos com tirotoxicose experimental.

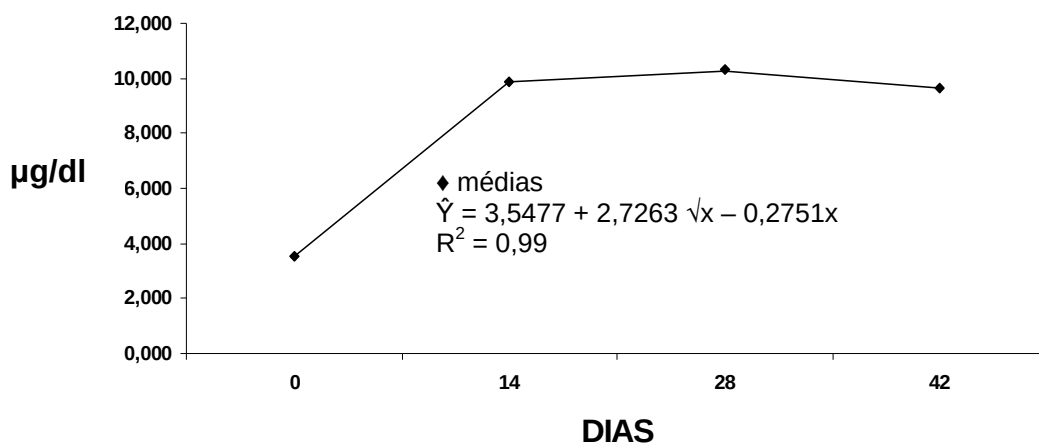


Figura 5- Análise de regressão dos valores médios de T<sub>4</sub> total (ug/dl) em gatos com tirotoxicose experimental.

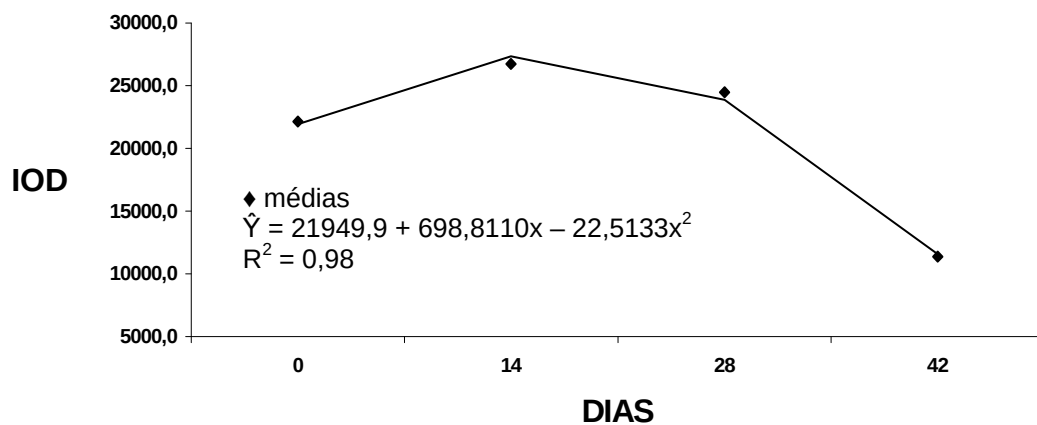


Figura 6- Análise de regressão dos valores médios da forma intermediária MMP –2 em gatos com tirotoxicose experimental.

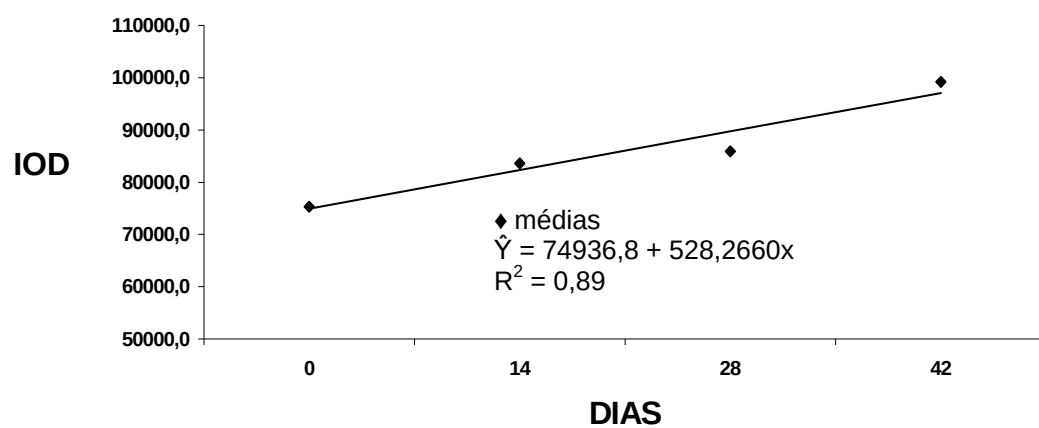


Figura 7- Análise de regressão dos valores médios da forma ativa da MMP-2 em gatos com tirotóxicose experimental.

# Trabalho 3

---

A ser encaminhado ao periódico Canadian Veterinary Journal

ISSN: 0008-5286

Endereço:

The Canadian Veterinary Medical Association  
339 rue Booth Street  
Ottawa, Ontario  
K1R 7K1

Normas para publicação disponível em:

<http://www.canadianveterinarians.net/vetjournals/cvj/instructions.html>

## **Caracterização da etiologia da hiperfosfataseemia em gatos com tirotoxicose induzida**

Characterization of hyperphosphatasemia etiology in cats with induced thyrotoxicosis

Fabiano Séllos COSTA<sup>1</sup>, Mauro José Lahm CARDOSO<sup>2</sup>,  
Lucy Marie Ribeiro MUNIZ<sup>3</sup>, Luiz Carlos VULCANO<sup>3</sup>,  
Paulo Roberto Rodrigues RAMOS<sup>4</sup>, Luís Antonio JUSTULIN JUNIOR<sup>5</sup>;  
Sérgio Luís FELISBINO<sup>6</sup>

Fonte Financiadora: FAPESP

1. Departamento de Medicina Veterinária, CCA - UFES, Alegre - ES / Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu.
2. FFALM – Bandeirantes – PR / Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu.
3. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu.
4. Departamento de Biofísica. Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu.
5. Departamento de Biologia Celular. Instituto de Biologia, UNICAMP.
6. Departamento de Morfologia. Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu.

## **Caracterização da etiologia da hiperfosfataseemia em gatos com tirotoxicose induzida**

### **Resumo:**

A tirotoxicose é caracterizada pelas excessivas concentrações séricas dos hormônios tireoidianos, podendo desencadear graves alterações no metabolismo ósseo. A hiperfosfataseemia é uma alteração laboratorial freqüentemente observada no hipertireoidismo felino, entretanto, poucos estudos avaliam a etiologia deste achado em gatos na ocorrência da doença. O aumento global dos níveis séricos de fosfatase alcalina pode ser decorrente de diferentes isoenzimas, sendo que, no caso do hipertireoidismo em humanos, as isoenzimas de origem óssea e hepática apresentam-se comumente elevadas. A partir da avaliação da bioquímica sérica de oito gatos com tirotoxicose induzida e hiperfosfataseemia associada, o presente trabalho demonstra um aumento significativamente maior dos níveis plasmáticos da fosfatase alcalina de origem óssea quando comparado com a isoenzima de origem hepática. Conclui-se que as alterações no metabolismo ósseo foram responsáveis pela ocorrência de hiperfosfataseemia nos gatos com tirotoxicose induzida.

**Palavras-chave:** Fosfatase alcalina, isoenzima, hipertireoidismo, gato

## **Introdução:**

O hipertireoidismo felino é uma alteração clínica multissistêmica resultante das excessivas concentrações dos hormônios tireoidianos, sendo atualmente considerado o distúrbio endócrino de maior incidência nos gatos domésticos (1-4).

Estudos experimentais com indução a um estado de tirotoxicose foram desenvolvidos em cães (5), ratos (6-8), felinos domésticos (9) e humanos (10), sendo possível demonstrar alterações no metabolismo ósseo, assim como ocorre no hipertireoidismo endógeno.

A reposição hormonal em excesso em humanos com hipotireoidismo, principalmente após a menopausa nas mulheres, pode produzir um estado hipermetabólico idêntico ao observado na tirotoxicose endógena, podendo ter como seqüela um remodelamento ósseo exagerado (11-13). Este fato assume destacada importância, uma vez que os hormônios da tireóide estão entre as medicações mais freqüentemente prescritas na medicina humana e a administração de uma dose acima da recomendada pode ocasionalmente ser encontrada (11).

A elevação dos níveis séricos de fosfatase alcalina total (hiperfosfatemia) é uma alteração laboratorial freqüente na ocorrência de hipertireoidismo em humanos (14-18) e nos felinos domésticos (1-4,19,20). São considerados valores normais para a espécie felina níveis séricos de FA total entre 10 e 35 U/L, onde os valores acima do limite superior caracterizam a ocorrência de hiperfosfatemia (23).

Protocolos experimentais de indução ao estado de tirotoxicose também promoveram hiperfosfatemia em ratas castradas (6) e gatos (9). Entretanto, os valores obtidos da avaliação bioquímica sérica desta enzima são resultantes da somatória das atividades das isoenzimas derivadas de diferentes tecidos do organismo, tais como fígado, osso, placenta, rins e intestino (14-23).

Na ocorrência do hipertireoidismo felino, são descritas alterações no metabolismo ósseo e lesões hepáticas. A análise histopatológica do fígado de gatos com hipertireoidismo pode revelar aumento do pigmento dos hepatócitos, presença de células inflamatórias mistas em região portal e áreas focais de degeneração gordurosa (24). Entretanto, uma disfunção hepática é

considerada rara na espécie humana e os achados histopatológicos observados são considerados discretos, inespecíficos e não apresentam correlação com a gravidade da doença (25).

Outros trabalhos também em gatos demonstraram a ação hormonal sobre o tecido ósseo, promovendo significativa desmineralização (9), elevação dos níveis de osteocalcina (20), diminuição dos níveis de paratormônio e alterações no metabolismo de cálcio e fósforo (26).

A caracterização e identificação das diferentes isoenzimas fornece informações clínicas úteis para localizar o tecido responsável pela hiperfosfatase, podendo auxiliar no direcionamento do diagnóstico e no tratamento (15-16). Nos pacientes com hipertireoidismo, tanto em humanos (14-18) como em felinos (19-20), a elevação da fosfatase alcalina total tem sido descrita como decorrente do aumento da atividade das isoenzimas de origem hepática e de origem óssea.

Além da avaliação da fosfatase alcalina total, a análise do perfil bioquímico sérico de enzimas que indicam lesão hepatocelular e colestase também podem auxiliar na diferenciação entre a ocorrência de alterações hepáticas ou ósseas. Valores de normalidade para a espécie felina das enzimas ALT, AST e GGT oscilam respectivamente entre 13 a 65 U/L, 20 a 50 U/L e 0 a 5 U/L (23).

No presente estudo, foram avaliadas as isoenzimas de origem óssea e hepática em gatos domésticos induzidos à tirotoxicose experimental e que apresentaram hiperfosfatase concomitante, com o objetivo de melhor caracterizar a etiologia deste achado laboratorial nesta enfermidade.

### **Materiais e métodos:**

Foram utilizados 16 gatos domésticos (*Felis catus*, L. 1758), adultos, sem distinção de sexo ou raça e sem alterações clínicas ou laboratoriais que pudessem interferir na realização da pesquisa. Animais em fase de crescimento, idosos, castrados e fêmeas gestantes foram excluídos do grupo experimental. Após a seleção, os animais foram alojados em um gatil com

acesso ao sol, sendo administrada alimentação (ração seca) e água à vontade. Após a realização do experimento, os gatos passaram por um período de desintoxicação de 10 dias, sendo posteriormente doados.

Para indução ao estado de tirotoxicose, administrou-se por via oral comprimidos com 150 µg/kg de levotiroxina sódica a cada 24 horas durante 42 dias. Semanalmente os gatos eram pesados e as doses para cada animal eram reajustadas conforme a necessidade. Todos os dados experimentais foram colhidos imediatamente antes do início da administração do medicamento, sendo este considerado momento um (M1). Para efeito comparativo, posteriormente novas avaliações foram realizadas ao término do período experimental de 42 dias, sendo este considerado o momento dois (M2)..

A dosagem dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos (T3 total, T4 livre e T4 total) foram obtidas nos dois momentos, pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, utilizando-se conjunto de reagente comercial sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, tendo como elemento radioativo traçador o Iodo<sup>125</sup>.

Os níveis séricos de fosfatase alcalina total foram mensurados pelo método AMP fotométrico cinético, utilizando-se conjuntos de reagentes comerciais específicos. Para melhor avaliação bioquímica do perfil hepático do grupo experimental, mensuraram-se também os níveis plasmáticos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamil transferase (GGT) pelo método de consumo de NADH fotométrico cinético, também sendo utilizado kits específicos para as dosagens enzimáticas.

Dos 16 animais inicialmente utilizados, foi selecionado um grupo experimental de oito animais que se apresentaram com elevação dos níveis séricos da fosfatase alcalina total após a administração hormonal, sendo confeccionado um “pool” de amostras séricas nos momentos inicial e final do experimento. Para a caracterização das isoenzimas da fosfatase alcalina, alíquotas com 4µl do “pool” das amostras foram submetidas à eletroforese sob condições não redutoras (100 V a 4°C) em gel de poliacrilamida a 8%. Posteriormente à eletroforese, os géis foram lavados com o tampão específico (Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,005M MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) sendo em seguida corados após incubação por 12 horas a 37°C com o substrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-

indoilfosfato) associado ao corante NBT (nitroblue tetrazolium). A atividade das isoenzimas da fosfatase alcalina foi mensurada obtendo-se a densidade óptica integrada (IOD), utilizando-se o programa computacional Image Master VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

Para a análise estatística das variações entre os momentos das variáveis fosfatase alcalina total, ALT, AST, GGT, T3 total, T4 livre e T4 total, utilizou-se o teste “t de Student”. Para a interpretação das letras, deve-se considerar que médias seguidas de uma mesma letra não diferem ao nível de 5% de significância. Para a caracterização do comportamento das isoenzimas da fosfatase alcalina, realizou-se o teste de regressão destas variáveis entre os momentos inicial e final do protocolo experimental.

## **Resultados:**

O protocolo utilizado para a indução ao hipertireoidismo foi eficaz, observado pela elevação estatisticamente significativa dos níveis séricos de T<sub>4</sub> livre e T<sub>4</sub> total (Tabela 1). Não foi caracterizada alteração significativa dos níveis séricos de T3 total após suplementação hormonal com levotiroxina sódica.

Associada à tirotoxicose promovida, é observada uma elevação significativa dos níveis séricos de fosfatase alcalina total após o início da administração hormonal ( $p < 0,01$ ), onde os valores médios apresentaram-se acima do limite máximo estabelecido para a espécie. A avaliação bioquímica sérica das enzimas ALT, AST e GGT não revelou alterações significativas entre os momentos estudados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

Conforme demonstrado nas figuras 1 e 2, pelo teste de regressão, a isoenzima de origem óssea apresentou marcante aumento entre os momentos inicial e final. A fosfatase alcalina de origem hepática apresentou-se aumentada em menor magnitude ao final do experimento, não havendo significância estatística.

## **Discussão:**

Como nesta pesquisa, outros autores também conseguiram promover uma tirotoxicose exógena a partir da administração oral de levotiroxina sódica (5-10), comprovando que os protocolos de indução podem servir como ensaios experimentais para melhor caracterização da doença clínica. As semelhanças nas alterações no tecido ósseo e níveis séricos de fosfatase alcalina total na tirotoxicose de origem exógena e endógena em humanos, conforme previamente descrito em mulheres submetidas a uma reposição hormonal excessiva (11), levam a considerar que fato semelhante ocorra nos gatos domésticos. Dessa forma, possivelmente a fisiopatologia da hiperfosfataseemia em ambos os casos seja similar.

Apesar do período de administração hormonal ter sido apenas de 42 dias, já foi possível caracterizar uma alteração estatisticamente significativa dos níveis séricos de fosfatase alcalina total. Dessa forma, assim como na tirotoxicose endógena, a hiperfosfataseemia foi uma alteração laboratorial comumente observada (1-4). As alterações metabólicas secundárias à administração experimental excessiva de hormônios tireoidianos também ocorreram rapidamente em estudos experimentais em cães (5), ratos (6-8), felinos domésticos (9) e humanos (10).

A caracterização das isoenzimas nos diferentes momentos experimentais foi possível de ser realizada por eletroforese sem um tratamento prévio com a enzima neuraminidase. Na espécie humana, esta enzima facilita a análise das isoenzimas da FA por promover uma maior redução da migração anódica da isoenzima óssea do que da isoenzima hepática durante a eletroforese. Entretanto, na espécie felina a sua utilização é controversa, havendo relatos que sua utilização pode ser benéfica (20,22), não influenciar nas análises ou, até mesmo, ser prejudicial (19, 21,23).

A ausência de alterações nos níveis plasmáticos das enzimas ALT, AST e GGT, associada à discreta e não significativa elevação da atividade da isoenzima da fosfatase alcalina de origem hepática demonstra sua pequena contribuição para a hiperfosfataseemia observada na tirotoxicose experimental em gatos. Tal fato concorda com demais trabalhos em humanos com

tirotoxicose, que observaram discretas alterações histopatológicas no parênquima hepático (25) e uma maior atividade da isoenzima da FA originária do tecido ósseo (15-18).

No hipertireoidismo felino de origem endógena, estudos retrospectivos (2) demonstram uma alta frequência de gatos com aumento de atividade das enzimas ALT e AST, estando estes achados laboratoriais presentes em aproximadamente 54% dos animais acometidos por esta enfermidade. Fatores como a coexistência de outras alterações hepáticas e um maior tempo de submissão ao estado de tirotoxicose nos gatos com a doença clínica, levando ao aparecimento de lesões tardias no parênquima hepático, podem, possivelmente, contribuir para a presença destes achados laboratoriais.

Pesquisas desenvolvidas em gatos com hipertireoidismo endógeno demonstram também uma elevação das isoenzimas de origem hepática contribuindo para a hiperfosfatase. Nesta pesquisa, a variação da FA hepática não foi significativa entre os momentos avaliados, sendo a FA óssea a principal responsável pela hiperfosfatase. Este acontecimento também já foi previamente observado por outros autores na espécie humana (14-18).

Gatos idosos apresentam maior incidência de hipertireoidismo, sendo observado que uma porcentagem inferior a 5% dos gatos apresenta-se com menos de 10 anos de idade ao momento do diagnóstico (4). Na espécie humana a faixa etária do paciente é considerada um fator importante para a interpretação dos valores de fosfatase alcalina total, onde há uma elevação fisiológica dos níveis séricos de FA hepática em pessoas idosas (14). Este fato observado em humanos parece estar correlacionado com a discreta alteração da FA de origem hepática observada no presente trabalho em gatos domésticos, uma vez que os animais utilizados no experimento eram em sua totalidade adultos jovens.

Conclui-se desta forma que a isoenzima da fosfatase alcalina de origem óssea foi a principal responsável pela ocorrência da hiperfosfatase nos gatos submetidos à tirotoxicose experimental. Ressalta-se também a eficiência do protocolo de indução ao estado de tirotoxicose, sendo possível caracterizar a influência hormonal sobre os níveis séricos de fosfatase alcalina total e de suas isoenzimas, contribuindo para melhor caracterizar a etiologia da hiperfosfatase no hipertireoidismo felino.

## Referências:

1. Thoday KL; Mooney CT. Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. *Veterinary Records* 1992, 131: 257-64.
2. Broussard JD, Peterson ME, Fox PR. Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1995, 206: 302.
3. Peterson ME, Kintzer PP, Cavanagh PG, et al. Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1983, 183: 103-110.
4. Mooney CT. Hyperthyroidism. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th. Ed. vol2. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005: 1544-1560.
5. Adams P, Jowsey J. Bone and mineral metabolism in hyperthyroidism: an experimental study. *Endocrinology* 1966, 81: 735-740.
6. Serakides R, Nunes, VA, Nascimento EF, et al. Relação tireóide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2000, 52: 579-585.
7. Pereira RC, Jorgetti v, Canalis, E. Triiodothyronine induces collagenase-3 and gelatinase B expression in murine osteoblasts. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 1999, 277: E496-E504.
8. Kung AW, Ng F. A rat model of thyroid hormone-induced bone loss: effect of antiresorptive agents on regional bone density and osteocalcin gene expression. *Thyroid*, 1994: 93-98.
9. Costa FS. Tirotoxicose experimental em gatos: efeitos sobre o tecido ósseo, níveis séricos de fosfatase alcalina e metabolismo de cálcio e fósforo. [MSc Dissertation]. Botucatu, São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2002.
10. Lukensmeyer WW, Hege JH, Theil GB, Wilson WR Calcium and phosphorus metabolic studies in triiodothyronine-induced hypermetabolism. *The American Journal of the Medical Science* 1970, 259: 282-291.

11. Fallon MD, Perry HM, Bergfeld, M, Droke D, Teitelbaum SL, Avioli LV  
Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis. *Archives of Internal Medicine*  
1983, 143: 442-444.
12. Foldes J, Tarjan G, Szathmari M, Krasznai I, Horvath C. Bone mineral  
density in patients with endogenous subclinical hyperthyroidism: is this  
thyroid status a risk factor for osteoporosis? *Clinical Endocrinology* 1993, 39:  
521-527.
13. Jodar E, Torres MM, Jiménez FE, Charneco MQ, Castillo JDL Bone loss in  
hyperthyroid patients and in former hyperthyroid patients controlled on  
medical therapy: influence of etiology and menopause. *Clinical*  
*Endocrinology* 1997, 47: 279-285.
14. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzyme *Clinical Chemistry* 1982, 28:  
2007-2016.
15. Rhone DP, Berlinger FG, White, FM. Tissue sources of elevated serum  
alkaline phosphatase activity in hyperthyroid patients. *American Journal of*  
*Clinical Pathology* 1980, 34: 381-386.
16. Tibi L, Patrick AN, Leslie P, Toft AD, Smith AF. Alkaline phosphatase  
isoenzymes in plasma in hyperthyroidism. *Clinical Chemistry* 1989, 35: 427-  
430.
17. Cooper DS, Kaplan MM, Ridgway EC, Maloof F, Daniels GH. Alkaline  
phosphatase isoenzyme patterns in hyperthyroidism. *Ann Intern Med* 1979,  
90: 164-168.
18. Gerlach U, Paul L, Latzel H. Isoenzymes of alkaline phosphatase in  
hyperthyroidism. *Enzimol Biol Clin* 1970, 11:251-256.
19. Foster DJ, Thoday KL. Tissue sources of serum alkaline phosphatase in 34  
hyperthyroid cats: a qualitative and quantitative study. *Research in*  
*Veterinary Science* 2000, 68: 89-94.
20. Archer FJ, Taylor SM. Alkaline phosphatase bone isoenzyme and  
osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. *Canadian Veterinary Journal*  
1986, 37: 735-739.
21. Hoffmann WE, Renegar, WE, Dorner, JI. Serum half-life of intravenously  
intestinal and hepatic alkaline phosphatase isoenzymes in the cat. *American*  
*Journal of Veterinary Research* 1977, 38: 1637-1639.

22. Horney BS, Farmer AJ, Mackensie A, Honor DJ, Buczkowski, S. Alkaline phosphatase isoenzymes in feline serum using an agarose gel alkaline phosphatase kit method. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1992, 56: 373-375.
23. Everett RM, Duncan JR, Prasse, KW. Alkaline phosphatases in tissues and sera of cats. *American Journal of Veterinary Research* 1977, 38: 1533-1538.
24. Feldman EC, Nelson RW *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia: WB Saunders, 1996:785p.
25. Klion FM, Segal R, Schaffner F. The effect of altered thyroid function on the ultrastructure of the human liver. *American Journal of Medicine* 1971, 50: 317-324.
26. Barber PJ, Elliot J. Study of calcium homeostasis in feline hyperthyroidism. *Journal of Small Animal Practice* 1996, 37: 575-582.

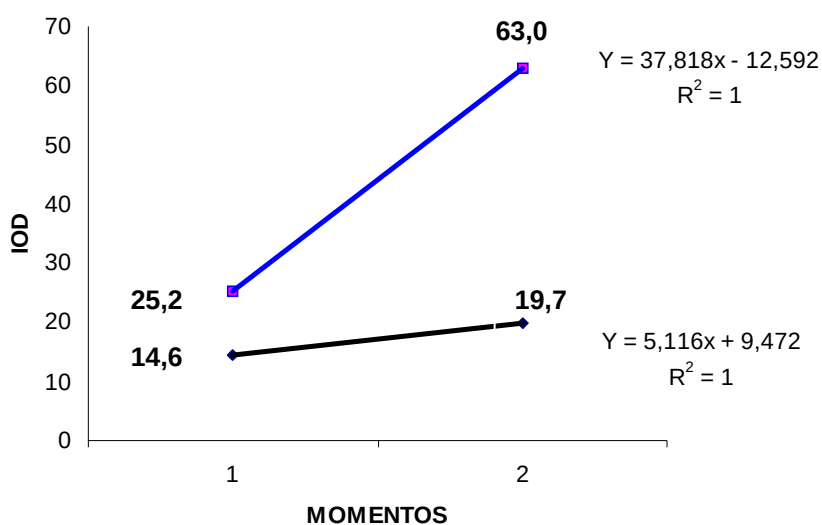


Figura 1: Análise de regressão dos valores de fosfatase alcalina óssea (reta azul) e hepática (reta preta) em gatos com tirotoxicose induzida.

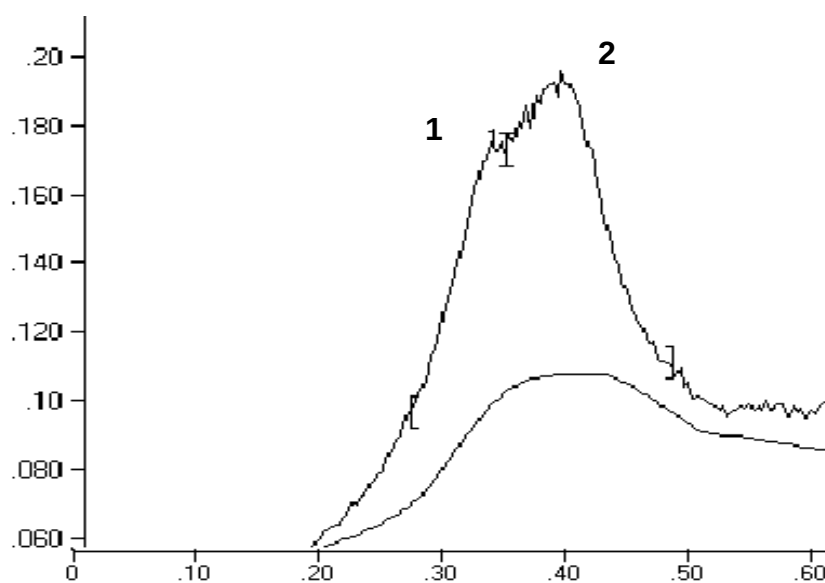


Figura 2 – Gráfico demonstrando a densidade óptica integrada após eletroforese das isoenzimas da fosfatase alcalina de origem hepática (1) e óssea (2) em gatos com tirotoxicose induzida.

Tabela 1: Valores séricos de T4 livre e T4 total em gatos avaliados antes (M1) e após tirotoxicose induzida (M2).

|          | T4 Livre<br>(ng/dl) |       | T4 total<br>(µg/dl) |       |
|----------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| Momentos | M1                  | M2    | M1                  | M2    |
| Média    | 0.47a               | 1.09b | 2.84a               | 9.10b |
| Mínimo   | 0.21                | 0.34  | 0.80                | 2.41  |
| Máximo   | 0.89                | 2.10  | 5.56                | 14.90 |
| SD       | 0.27                | 0.69  | 1.81                | 4.17  |

SD – Desvio padrão

Tabela 2: Valores bioquímicos séricos para avaliação do perfil hepático em felinos avaliados antes (M1) e após tirotoxicose induzida (M2).

|          | FA<br>(U/L) |     | ALT<br>(U/L) |     | AST<br>(U/L) |     | GGT<br>(U/L) |      |
|----------|-------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|------|
| Momentos | M1          | M2  | M1           | M2  | M1           | M2  | M1           | M2   |
| Média    | 38a         | 83b | 66a          | 72a | 28a          | 32a | 0,12a        | 0,3a |
| Mínimo   | 21          | 40  | 49           | 46  | 15           | 15  | 0            | 0    |
| Máximo   | 71          | 141 | 100          | 114 | 38           | 34  | 1            | 2    |
| SD       | 19          | 41  | 16           | 23  | 8            | 7   | 0,3          | 1,0  |

FA – fosfatase Alcalina, ALT - alanina aminotransferase, AST - aspartato aminotransferase, GGT – gama glutamiltransferase, SD – desvio padrão.

# Discussão Geral

---

## DISCUSSÃO GERAL

O fato de o hipertiroidismo ser a endocrinopatia de ocorrência mais freqüente na espécie felina, conforme amplamente relatado na literatura (THODAY; MOONEY, 1992; MOONEY et al., 1998; MOONEY, 2005), faz necessária uma investigação detalhada sobre os aspectos clínicos e fisiopatológicos desta enfermidade. Com relação ao estudo das alterações sobre o tecido ósseo em gatos domésticos, são citados trabalhos com casos de hipertiroidismo endógeno (ARCHER; TAYLOR, 1996; BARBER; ELLIOTT, 1996; FOSTER; THODAY, 2000) e exógeno (COSTA, 2002; COSTA et al., 2004). Assim como neste trabalho, os autores supracitados também observaram alterações sobre o metabolismo ósseo, entretanto, vários aspectos ainda necessitam de maiores estudos.

A realização de indução ao estado hipertiroideo foi eficaz, promovendo uma elevação estatisticamente significativa dos níveis séricos de T4 livre e T4 total. Fallon e outros (1983) demonstram semelhanças nas alterações do tecido ósseo na tirotoxicose de origem exógena e endógena em mulheres submetidas a uma reposição hormonal excessiva. Dessa forma, a partir deste estudo experimental, pode-se deduzir que as alterações observadas nos animais utilizados também estarão presentes no hipertiroidismo endógeno felino.

Trabalhos experimentais em animais também assumem grande importância na área médica, uma vez que a utilização dos protocolos de indução à tirotoxicose em animais permite uma melhor compreensão dos aspectos clínicos, laboratoriais e fisiopatológicos do hipertiroidismo na espécie humana.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram claramente uma ação dos hormônios tireoidianos sobre o metabolismo ósseo dos gatos, promovendo significativa desmineralização óssea, aumento da atividade da isoenzima da fosfatase alcalina de origem óssea e elevação dos níveis séricos das metaloproteinases de matriz -2 e -9.

A avaliação laboratorial da atividade das isoenzimas da fosfatase alcalina em pacientes com hipertiroidismo apresenta importância clínica para o controle dos sintomas da doença em humanos (RICHTER; OHLEN, 1971;

RHONE et al., 1980; ROSALKI; FOO, 1984; ROSALKI; FOO, 1985; SCHREIBER; SADRO, 1988; TIBI et al., 1989). Esta análise auxilia no direcionamento do diagnóstico e tratamento dos doentes, sendo também importante sua realização para um melhor manejo do paciente felino com hipertireoidismo. Mesmo sendo demonstrada maior atividade da isoenzima de origem óssea nos resultados apresentados, deve-se considerar que outras enfermidades, principalmente em gatos idosos, podem estar associadas ao hipertireoidismo e contribuir para uma hiperfosfataseemia.

Pesquisas futuras podem melhor caracterizar a hiperfosfataseemia a partir da caracterização das diferentes isoformas das isoenzimas da fosfatase alcalina. Técnicas desenvolvidas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) são descritas com este objetivo para humanos (MAGNUNSON et al., 1992) e ratos (DZIEDZIEJKO et al., 2005), entretanto, nenhum estudo ainda foi realizado com a espécie felina.

O aumento da atividade das MMPs -2 e -9 presente demonstra a atuação destas enzimas no processo de remodelamento do tecido ósseo por atuação na degradação da matriz colágena, fato este também citado por Pereira e outros (1999). Este achado indica a necessidade futura da utilização de drogas inibidoras das metaloproteinases para o controle do processo de desmineralização óssea secundária ao hipertireoidismo, assim como descrito para processos neoplásicos (MATRISIAN, 1990; VISSE; NAGASE, 2003).

A tirotoxicose induzida nos gatos foi capaz de promover efeitos precocemente, onde com 15 dias de administração hormonal exógena já eram presentes uma significativa perda de massa óssea, hiperfosfataseemia e alteração nas metaloproteinases de matriz. Esses achados concordam com trabalhos realizados em ratos (ENGFELDT; HJERTQUIST, 1954; ADAMS; JOWSEY, 1966; MUNDY et al., 1976; KUNG; NG, 1994; GOUVEIA et al., 1997; SERAKIDES et al., 2000a, SERAKIDES et al., 2000b) e gatos (BABINSKI et al., 2001; COSTA, 2003; COSTA et al., 2004), nos quais a tirotoxicose induzida rapidamente promoveu alterações no metabolismo ósseo.

Relatos na medicina humana demonstram casos de tirotoxicose iatrogênica após reposição hormonal inadequada (FALLON et al., 1983; ADLIN et al., 1991; DIAMOND et al., 1991; MEDEIROS NETO, 1995). Ressalta-se desta forma a importância da correta prescrição dos medicamentos utilizados

em pacientes com hipotireoidismo, assim como um contínuo acompanhamento clínico dos mesmos, tanto na espécie humana como em animais. Conforme observado nestes resultados com gatos domésticos, é provável que uma dose acima da recomendada também promova alterações significativas em um curto intervalo de tempo em humanos e outras espécies animais.

A metodologia de densitometria óptica em imagens radiográficas, utilizada para determinação da DMO da extremidade distal do rádio dos gatos, apresentou grande utilidade para a avaliação seqüencial da perda de massa óssea, fato também observado por Rahal e outros (2001) na espécie felina. Desta forma, além da importância da realização de trabalhos que visavam o estabelecimento de valores de referência para diversas espécies animais (LOUZADA, 1994; GALLO et al., 1996; LOUZADA et al., 1997; VULCANO et al., 1997, VULCANO et al., 1998; VULCANO, 2001), esta técnica densitométrica permite avaliar com segurança a evolução de processos de desmineralização óssea que podem estar presentes em diversas enfermidades. Acredita-se também, com base nos achados deste experimento, que esta técnica também possibilite avaliar precisamente a involução de um processo de desmineralização óssea em enfermidades onde o tratamento é possível, como no caso do hipertireoidismo felino.

O estrógeno apresenta um papel importante para evitar a ocorrência de osteoporose na espécie humana. No caso do hipertireoidismo, mulheres após a menopausa apresentam maior grau de desmineralização óssea e conseqüentemente um maior risco de ocorrência de fraturas patológicas (FALLON et al., 1983; ADLIN et al., 1991; DIAMOND et al., 1991; MEDEIROS NETO, 1995; GOUVEIA et al., 1997). Não foi possível neste trabalho correlacionar os níveis de estrógeno circulante com os demais parâmetros avaliados, uma vez que as gatas castradas foram excluídas do grupo experimental. Costa e outros (2004) relatam três casos de gatas castradas submetidas a tirotoxicose experimental que se apresentaram com maior desmineralização óssea quando comparadas ao grupo controle. Apesar deste achado, tornam-se necessárias outras pesquisas para melhor caracterização da importância dos níveis séricos de estrógeno na ocorrência de desmineralização óssea secundária ao hipertireoidismo em gatos.

A somatória dos resultados observados permitiu caracterizar importantes efeitos dos hormônios tireoidianos sobre o metabolismo ósseo em felinos domésticos, entretanto, novos estudos ainda devem ser desenvolvidos para melhor compreensão dos efeitos da tirotoxicose sobre o metabolismo ósseo, possibilitando melhor caracterização desta enfermidade nos felinos domésticos, como também em outras espécies animais e na espécie humana.

# Conclusões Gerais

---

## CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições em que foi realizado este experimento e de acordo com os resultados obtidos, podem ser apresentadas as seguintes conclusões para gatos submetidos à administração oral de 150µg/kg de levotiroxina sódica a cada 24 horas durante 42 dias:

1. O protocolo é eficaz para a indução a tirotoxicose e aumenta significativamente os níveis séricos de  $T_4$  livre e  $T_4$  total a partir da primeira semana de tratamento.
2. A densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio direito diminui significativamente a partir da primeira semana, em decorrência da tirotoxicose induzida.
3. A densitometria óssea em imagens radiográficas é um método útil, preciso e de custo relativamente baixo. A técnica proporciona a determinação seqüencial da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio direito de forma eficaz.
4. A forma ativa da MMP –2 eleva-se significativamente em decorrência da administração exógena dos hormônios tireoidianos.
5. A desmineralização óssea existente na extremidade distal do rádio é acompanhada de aumento da atividade das metaloproteinases de matriz –2 e –9.

6. A fosfatase alcalina sérica total aumenta significativamente, sendo influenciada pelos altos níveis plasmáticos de  $T_4$  livre e  $T_4$  total.
7. É possível a caracterização das isoenzimas da fosfatase alcalina de origem óssea e hepática pela técnica de eletroforese sem a realização de um pré-tratamento das amostras com neuraminidase.
8. A isoenzima da fosfatase alcalina de origem óssea é a principal responsável pela hiperfosfatemia nos gatos com tirotoxicose induzida.

# Referências

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

- ADAMS, P.; JOWSEY, J. Bone and mineral metabolism in hyperthyroidism: an experimental study. **Endocrinol.**, v. 81, p. 735-740, 1966.
- ADLIN, E. V.; MAURER, A. H.; MARKS, A. D.; CHANNICK, B.J. Bone mineral density in postmenopausal women treated with L-Thyroxine. **Am. J. Med.**, v. 90, p. 360-306, 1991.
- AL-HITI, J.; THOMAS, B. J.; AL-TIKRITY, S. A.; ETTINGER, K. V.; FREMLIN, J. H.; DABEK, J. T. Spinal calcium. Its in vivo measurement in man. **J. Appl. Radiat. Isotopes**, v. 27, p. 97, 1976.
- ALLAIN, T. J.; MCGREGOR, A. M. Thyroid hormones and bone. **J. Endocrinol.**, v. 139, p. 9-18, 1993.
- ARCHER, F. J.; TAYLOR, S. M. Alkaline phosphatase bone isoenzyme and osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. **Can. Vet. J.**, v. 37, p. 735-739, 1996.
- AUWERX, J.; BOUILLON, R. Mineral and bone metabolism in thyroid disease: a review. **Quat. J. Med.**, v. 60, p. 737-752, 1986.
- BABINSKI, L. K.; HAENISCH, S. L.; COSTA, F. S.; CARDOSO, M. J. L.; MUNIZ, M. J. L.; LAMBERTI, D.G. Avaliação radiográfica do eixo ápico-basilar do coração em gatos (*Felis catus*, L. 1758) após tirotoxicose induzida. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA FELINA, 2001, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: 2001, p. 37-8.
- BARBER P. J., ELLIOT, J. Study of calcium homeostasis in feline hyperthyroidism. **J. Small An. Pract.**, v. 37, p. 575-582, 1996.
- BIANCHI, G. S. Le retentissement osseux des hyperthyroidies. **Lion Med.**, 1970.

---

<sup>1</sup> \*Universidade Federal do Espírito Santo. Biblioteca Central. Guia para normalização de referências: NBR 6023:2002 / Universidade Federal do Espírito Santo, Biblioteca Central – 3. 3d. – Vitória: A Biblioteca, 2005, 61p.

- BOTTONI, C.; FERRO, E.; SALIMEI, E. Electrophoresis using pretreatment of serum with neuraminidase and affinity electrophoresis in the evaluation of ALP isoenzymes. **Vet. Res. Communic.**, v. 27; p. 731-733, 2003.
- BROUSSARD, J. D., PETERSON, M. E., FOX, P. R. Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 206, n. 302, 1995.
- CIVITELLI, R.; HRUSKA, K. A.; JEFFREY, J. J.; KAHN, A. J.; AVIOLI, L. V.; PARTRIDGE, N. C. Second messenger signaling in the regulation of collagenase production by osteogenic sarcoma cells. **Endocrinol.**, v. 124, p. 2928-2934, 1989.
- COSMAN, F.; HERRINGTON, B.; HIMMELSTEIN, S.; LINDSAY, R. Radiographic absorptiometry: A simple method for determination of bone mass. **Osteoporosis Int.**, v. 2, p. 34-38, 1991.
- COSTA, F. S. **Tirotoxicose experimental em gatos**: efeitos sobre o tecido ósseo, níveis séricos de fosfatase alcalina e metabolismo de cálcio e fósforo. 2002. 101f. Dissertação (Mestrado em Radiologia Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- COSTA, F. S.; CARDOSO, M. J. L.; MUNIZ, L. M. R.; VULCANO, L. C.; PADOVANI, C. R. Avaliação da densidade mineral óssea em gatas castradas após tirotoxicose induzida. **Veterinária Ser**, v. 1, n. 2, 2004.
- CROVACE, A.; MOLFETTA, L.; BOCCIA, G.; DIBELLO, A.; MASTRONARDI, M. Densitometria ossea computerizzata nella malattia di Legg - Calvé - Perthes nel cane. **Obj. Doc. Vet.**, v.11, p. 61-64, 1990.
- 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.
- DZIEDZIEJKO, V.; SAFRANOW, K.; SLOWIK-ZYLKA, D.; MACHOY-MOKRZYNSKA, A.; MILLO, B.; MACHOY, Z.; CHLUBEK, D. Comparasion of rat and human alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms using HPLC and electrophoresis. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1752, p. 26-33, 2005.
- EKMAN, B.; LJUNGQUIST, K. G., STEIN, U. Roentgenologic – photometric method for bone mineral determination. **Acta Radiol. Diag.**, v. 10, p. 305, 1970.

- ENGFELDT, B.; HJERTQUIST, S. V. **Acta Endocr. (Kobenhavn)**, v. 15, p. 159, 1954.
- EVERETT, R. M.; DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. Alkaline phosphatases in tissues and sera of cats. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, p. 1533-1538, 1977.
- 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. 442-444, 1983.
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders Compaany, 1996, 785p.
- FINKELSTEIN, J.S. Osteoporose. In: BENNETT, J.C. & PLUM, F. (eds.) **Cecil - Tratado de Medicina Interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. v.2, p.1526-1532.
- FISHMAN, W. H., GHOSH, N. K. Isoenzymes of human alkaline phosphatase. In: **Adv. Clin. Chem.**, New York, 1967.
- FOLDES, J.; TARJAN, G.; SZATHMARI, M.; KRASZNAI, I.; HORVATH, C. Bone mineral density in patients with endogenous subclinical hyperthyroidism: is this thyroid status a risk factor for osteoporosis? **Clin. Endocrinol.**, v. 39, p. 521-527, 1993.
- FOSTER, D. J., THODAY, K. L. Tissue sources of serum alkaline phosphatase in 34 hyperthyroid cats: a qualitative and quantitative study. **Res. Vet. Sci.**, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2000.
- GALLO, R. N.; RAHAL, S. C.; VULCANO, L. C.; LOUZADA, M. J. K. Q. 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.
- GERLACH, U.; PAUL, L.; LATZEL, H. Isoenzymes of alkaline phosphatase in hyperthyroidism. **Enzymol. Biol. Clin.**, v. 11, p. 251-256, 1970.
- GILLICH, K. H.; KRÜSKEMPER, H. L.; SCHIMIDT, E.; ZEIDLER, U. Die aktivität der alkalischen phosphatase im serum als kriterium der skelettbeteiligung bei der hyperthyreose. In: XIV SYMPOSITION DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR ENDOKRINOLOGIE, 1968, Berlin. **Anals...** Berlin, 1968.

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. 2098-2107, 1997.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of matrix metalloproteinases inhibitors in cancer therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 93, p. 178-193, 2001.

HOFFMANN, W. E.; RENEGAR, W. E., DORNER, J. L. Serum half-life of intravenously intestinal and hepatic alkaline phosphatase isoenzymes in the cat. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, p. 1637-1639, 1977.

HORNEY, B. S., FARMER, A. J., MACKENSIE, A., HONOR, D. J., BUCZKOWSKI, S. Alkaline phosphatase isoenzymes in feline serum using na agarose gel alkaline phosphatase kit method. **Can. J. Vet. Res.**, v. 56, p. 373-375, 1992.

ITOH, H.; KAKUDA, T.; GENDA, G.; SAKONJU, I.; TAKASE, K. Canine serum alkaline phosphatase isoenzymes detected by polyacrylamide gel disk electrophoresis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 64, p. 35-38, 2002.

JODAR, E.; TORRES, M. M.; JIMÉNES, F. E.; CHARNECO, M. Q.; CASTILLO, J. D. L. Bone loss in hyperthyroid patients and in former hyperthyroid patients controlled on medical therapy: influence of etiology and menopause. **Clin. Endocrinol.**, v. 47, p. 279-285, 1997.

JOHN, A.; TUSZYNSKI, G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 7, n. 1, p. 14-23, 2001.

JUSTULIN JUNIOR, L. A. **A atividade das metaloproteínas de matriz e a regeneração estromal da próstata ventral de ratos durante o processo de recuperação glandular por reposição hormonal com testosterona após 21 dias de castração.** 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Estadual de Campinas, 2005.

KLION, F.M.; SEGAL, R.; SCHAFFNER, F. The effect of altered thyroid function on the ultrastructure of the human liver. **Am. J. Med.**, v. 50, p. 317-324, 1971.

KOUTRAS, D. A., PANDOS, P. G., KOUKOULOMMATI, A. S., CONSTANTES, J. Radiological signs of bone loss in hyperthyroidism. **Br. J. Radiol.**, v. 46, p. 695-698, 1973.

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.93-98, 1994.

LÉGER, J.; CZERNICHOW, P.; GARABÉDIAN, M.; BRAUNER, R.; RAPPAPORT, R. Ostéopénie grave chez de jeunes enfants atteints d'hyperthyroïdie. **Arch. Fr. Pédiatr.**, v. 43, p. 123-125, 1986.

LOGAN, M. A.; CHRISTENSEN, W. R.; KIRKLIN, J. W. **Am. J. Physiol.**, v. 135; p. 419, 1942.

LOUKOPOULOS, P.; MUNGALL, B. A.; STRAW, R. C., THOMTOM, J. R., ROBINSON, W. F. Matrix metalloproteinase -2 and -9 involvement in canine tumors. **Vet. Pathol.**, v. 40, p. 382-394, 2003.

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, Campinas, 1994.

LOUZADA, M. J. Q.; BELANGERO, W. D.; PELÁ, C. A.; SANTOS - PINTO, R. Avaliações da densidade óssea em radiografias – I metodologia. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA, 1996, Curitiba. **Anais...** 1996.

LOUZADA, M. J. Q.; PELÁ, C. A.; BELANGERO, W. D.; SANTOS - PINTO, R. Densidade de peças ósseas de frangos. Estudo pela densitometria óptica radiográfica. **Vet. e Zootec.**, v. 9, p. 95-109, 1997.

LUKENSMEYER, W. W.; HEGE, J. H.; THEIL, G. B.; WILSON, W. R. Calcium and phosphorus metabolic studies in triiodothyronine-induced hypermetabolism. **Am. J. Med. Sci.**, v. 259, p. 282-291, 1970.

MAGNUNSON, P.; SHARP, C. A.; FARLEY, J. R. Different distributions of human bone alkaline phosphatase isoforms in serum and bone tissue extracts. **Clin. Chim. Acta**, v. 325, p. 59-70, 2002.

MARKEL, M.; BOGDANSKE. Dual-energy X- ray absorptiometry of canine femurs with and without fracture fixation devices. **Am. J. Vet. Res.**, v. 55, p. 462-466, 1994.

MATRISIAN, L. M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. **Trend. Genet.**, v. 6, p. 121-125, 1990.

- MAUVIEL, A. Cytokine regulation of metalloproteases expression. **J. Cell. Biochem.**, v. 53, p. 95-109, 1997.
- MEDEIROS NETO, G. A. Osteopenia e tratamento com L-tiroxina. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 41, n. 1, p.34-36, 1995.
- MEEMA, H. E.; SCHATZ, D. L. Simple radiologic demonstration of cortical bone loss in thyrotoxicosis. **Radiology**, v. 97, p. 9-15, 1970.
- MELSEN, F.; MOSEKILDE, L. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hyperthyroidism. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 85, n. 141, 1977.
- MEUNIER, P. J. Hyperthyroidies et ostéoporose. **Ann Endocrinol.**, v. 56, p. 57-59, 1995.
- MOOK, O. R.; FREDERIKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1705, p. 69-89, 2004.
- MOONEY, C. T. Feline hyperthyroidism. In: TORRANCE A. G., MOONEY, C. T. **Manual of Small Animal Endocrinology**, Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association, 1998, p.115-126.
- MOONEY C. T. Hyperthyroidism. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6th. ed., vol. 2, St. Louis: Elsevier Saunders, 2005: 1544-1560.
- MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E. F.; CHARLES, P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 19, n. 1, p. 35-63, 1990.
- MOSS, D. W. Alkaline phosphatase isoenzyme. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 10, p. 2007-2016, 1982.
- MOSS, D. W.; EDWARDS, R. K. Improved electrophoretic resolution of bone and liver alkaline phosphatases resulting from partial digestion with neuraminidase. **Clin. Chem. Acta**, v. 143, p. 177-182, 1984.
- MUIR, P; MARCKEL, D. M; BOGDANSKE, J.; JOHNSON, A.K. Dual - energy X-ray absorptiometry and force-plate analysis of gait in dogs with healed femora after Leg-Lengthening plate fixation. **Vet. Surg.**, v. 24, p. 15-24, 1995.
- MUNDY, G. R.; SHAPIRO, J. L.; BANDELIN, J. G.; CANALIS, E. M.; RAISZ, L. G. Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. **J. Clin. Invest.**, v. 58, p. 529-534, 1976.

- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Fundamentos de Medicina Interna em Pequenos Animais** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 1074p.
- NEWTON, C. D.; BIERY, D. N. Moléstias esqueléticas. In: ETTINGER, S. J. (Ed.) **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, São Paulo: Manole, 1992, v. 4, p. 2494-517.
- PATRIDGE, N. C.; JEFFREY, J. J.; EHLICH, L. S.; TEITELBAUM, L. S.; FLISZAR, C.; WELGUS, H. G.; KAHN, A. J. Hormonal regulation of the production of collagenase and a collagenase inhibitor activity by rat osteogenic sarcoma cells. **Endocrinol.**, v. 120, p. 1956-1962, 1987.
- PEREIRA R. C.; JORGETTI V.; CANALIS, E. Triiodothyronine induces collagenase-3 and gelatinase B expression in murine osteoblasts. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 1999, v. 277: p. E496-E504.
- PETERSON, M. E. Hyperthyroid diseases. In: ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. (Eds.) **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, WB Saunders Co, 1995, p. 1466-501.
- 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. Ass.**, v. 183, n. 1, p.103-110, 1983.
- RAHAL, S. C.; MORTARI, A. C.; CAPORALI, E. H. G.; VULCANO, L. C.; SANTOS, F. A. M.; TAKARIRA, R. K. Emprego da densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA FELINA, 2001, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2001, p. 35.
- RAWDANOWICZ, T. J.; HAMPTON, A. L., NAGASE, H.; WOOLLEY, D. E.; SALAMONSEN, L. A. Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 79, n. 3, p. 530-536, 1994.
- REICH, N. E.; SEIDLMANN, F. E.; TUBBS, R. R.; MACLINTYRE, W. J.; MAENY, T. F.; ALFIDI, R. J.; PEPE, R. G. Determination of bone mineral content using CT scanning. **Am. J. Roentgenol.**, v. 127, p. 593, 1976.
- RHONE, D. P.; BERLINGER, F. G.; WHITE, F. M. Tissue sources of elevated serum alkaline phosphatase activity in hyperthyroid patients. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 34, p. 381-386, 1980.

- RICHTER, J.; OHLEN, J. Hyperthyreose und die isoenzyme der alkalischen phosphatase. **Dtsch. Med. Wschr.**, v. 96, p. 196-202, 1971.
- ROBINSON, J. C.; PIERCE, J. E. Differential action of neuraminidase on human serum alkaline phosphatases. **Nature**, v. 204, p. 472-473, 1964.
- ROSALKI, S. B.; FOO, A. Y. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. **Clin. Chem.**, v. 30, p. 1182-1186, 1984.
- ROSALKI, S. B.; FOO, A. Y. Incubation with neuraminidase and affinity electrophoresis with wheat-germ lectin compared for separating and quantifying alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. **Clin. Chem.**, v. 32, p. 1198-1200, 1985.
- SATO, K.; HAN, D. C.; FUJI, Y.; TUSHIMA, T.; SHIZUME, K. Thyroid hormones stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2.8) through 3, 5, 3'- triiodo-L-thyronine nuclear receptors. **Endocrinol.**, v. 120, n. 5, p. 1873-1881, 1987.
- 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. 547-554, 1999.
- SCHREIBER, W. E.; SADRO, L. C. Agarose gel patterns of alkaline phosphatase isoenzymes before and after treatment with neuraminidase. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 90, n. 2, p. 181-186, 1988.
- SEEGER, L. L. Bone density determination. **Spine**, v. 22, n. 245, p. 49s-57s, 1997.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; NASCIMENTO, E. F.; RIBEIRO, A. F. C.; ZIBAOU, H. M.; SILVA, C. M. Hipogonadismo e função tireoidiana em ratas hipertireóideas e eutireóideas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 6, p. 571-578, 2000.
- 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. Zootec.**, v. 52, n. 6, p. 579-585, 2000.
- SORENSEN, K. C.; KITCHELL, B. E.; SCHAEFFER, D. J.; MADRIS, P. E. Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas. **Am. J. Vet. Res.**, v. 65, p. 373-379, 2004.

THEODOSIOU, N. G.; CHATOT, C. L.; ZIOMEK, C. A. Chemiluminescent detection of alkaline phosphatase in Phast-Gel. **Biotech.**, v. 13, p. 257-264, 1992.

THODAY, K. L.; MOONEY, C. T. Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. **Vet. Rec.**, v. 131, p.257-264.

TIBI, L.; PATRICK, A. N.; LESLIE, P.; TOFT, A. D.; SMITH, A. F. Alkaline phosphatase isoenzymes in plasma in hyperthyroidism. **Clin. Chem.** 1989, v. 35: p. 427-430.

VAN HOOFF, V. O.; LEPOUTRE, L. G.; HOYLAERTS, M. F.; CHEVIGNÉ, R.; DE BROE, M. E. Improved agarose electrophoresis method for separating alkaline phosphatase isoenzyme in serum. **Clin. Chem.**, v. 34, p. 701-703, 1970.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Circ. Res.**, v. 92, p. 827-839, 2003.

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, 1998, **Anais...** Buenos Aires, 1998.

VULCANO, L. C. **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.** 2001. 52p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

VULCANO, L. C.; CIARLINI, L. D. R. P.; LOUZADA, M. J. Q.; CALDAS, E. L. C. Valores normais da densidade óssea do carpo ulnar em potros em crescimento da raça Quarto de Milha através da densitometria óptica radiográfica. **A Hora Veterinária**, v. 17, n. 100, p.52-54, 1997.

WASSERMAN, R. H. Ossos. In: SWENSON, M. J. (Ed.) **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10. ed., 1988, p. 413-427.

PEREIRA R. C.; JORGETTI V.; CANALIS, E. Triiodothyronine induces collagenase-3 and gelatinase B expresssion in murine osteoblasts. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabolism** 1999, v. 277: p. E496-E504.

WENTWORTH, R. A., KALLFELZ, F. A. A., HILTZ, F. L., SCHRYVER, H., SHEFFTY, B. KROOK, L. P. *In vivo* estimation of bone mineral content. A research and diagnostic technique for veterinary medicine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 32, p. 985, 1971.

# Anexos

---

## DETALHAMENTO DO PREPARO DOS ANIMAIS E DA COLHEITA DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS

### OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 16 gatos domésticos (*Felis catus*, L. 1758) com idade acima de um ano, sem distinção de sexo ou raça. Somente foram selecionados animais com um bom estado de saúde, sem alterações clínicas ou laboratoriais que pudessem interferir na realização do experimento.

Fêmeas castradas e gestantes foram excluídas, assim como animais que ainda se apresentavam em fase de crescimento, na tentativa de formação de um grupo de animais mais homogêneo e para evitar possíveis interferências nos resultados finais.

Os gatos eram provenientes do gatil da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista em Presidente Prudente e do Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu.

### PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram alojados e mantidos em compartimentos individuais de ferro esmaltado que possuíam um piso de alumínio removível, facilitando assim os procedimentos de higienização. No interior das gaiolas foram colocadas para os animais bandejas sanitárias plásticas com areia apropriada para defecarem e urinarem, sendo estas constantemente limpas.

Em pequenos potes plásticos, foram fornecidas ração comercial seca<sup>2</sup> e água à vontade. O local onde se encontrava as gaiolas recebia grande luminosidade durante o dia e diariamente os animais tiveram acesso a solários onde podiam tomar sol e se movimentar com maior intensidade.

---

<sup>2</sup> Whiskas® carne

Anteriormente ao início dos procedimentos experimentais, os animais foram submetidos a um período de 14 dias para adaptação às novas condições de vida e para uma melhor observação clínica. No primeiro dia deste período, todos os animais foram vacinados<sup>3</sup> contra raiva, panleucopenia, rinotraqueíte e calicivirose, e receberam tratamento antiparasitário tópico<sup>4</sup> e vermífugo oral<sup>5</sup>.

Após o término do protocolo experimental, os animais passaram por um período médio de 10 dias de observação para a regressão dos sintomas clínicos presentes secundários da tirotoxicose induzida, sendo doados em seguida.

## INDUÇÃO À TIROTOXICOSE EXPERIMENTAL

Foram utilizados comprimidos de levotiroxina sódica<sup>6</sup> nas concentrações de 25, 50 e 100µg para a indução da tirotoxicose. Cada animal recebeu uma dose aproximada de 150µg/kg diariamente, a cada 24 horas, durante 42 dias. Semanalmente os gatos eram pesados e, nos casos em que houve uma diminuição de peso corporal, secundários aos efeitos do excesso dos hormônios tireoidianos, as doses de levotiroxina sódica foram recalculadas e ajustadas para a manutenção da dose de 150µg/kg de levotiroxina sódica por dia.

## COLHEITA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Imediatamente antes do início da administração da levotiroxina sódica foram colhidas amostras de sangue que serviram como controle dos níveis hormonais de T<sub>3</sub> total, T<sub>4</sub> livre e T<sub>4</sub> total, assim como controle dos valores

---

<sup>3</sup> Fel-o-vax® PCT – Fort Dodge

<sup>4</sup> Frontline® top spot gato - Merial

<sup>5</sup> Drontal® gatos – Merial

<sup>6</sup> Tetroid® 50mcg - Aché

séricos dos demais parâmetros avaliados. Novas amostras de sangue foram posteriormente colhidas para efeito comparativo com o momento inicial.

A colheita sangüínea foi realizada por venopunção jugular, sendo previamente realizada tricotomia do local para facilitar o procedimento. Os animais foram mantidos em decúbito lateral direito ou esquerdo, de acordo com a veia que apresentasse melhores condições para realização do procedimento.

Utilizaram-se para a punção jugular, agulhas<sup>7</sup> para colheita múltipla de sangue a vácuo 25x8mm descartáveis em tubos de vidro<sup>8</sup> com volume de aspiração de 6ml, com gel separador inerte ao soro e ativador de coágulo. As amostras posteriormente foram centrifugadas em 3.500 rotações por minuto, durante 5 a 10 minutos, para a obtenção do soro. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em frascos apropriados, identificadas e armazenadas a uma temperatura média de -20°C em um freezer, para posterior realização das dosagens hormonais e obtenção dos valores bioquímicos a serem analisados.

## **METODOLOGIA DETALHADA PARA A REALIZAÇÃO DAS DOSAGENS DOS HORMÔNIOS TIROIDIANOS**

As dosagens hormonais dos níveis séricos de T3 total, T4 livre e T4 total foram realizadas em sua totalidade no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

### **DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE T<sub>3</sub> TOTAL**

O T<sub>3</sub> total sérico foi obtido pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, utilizando-se conjunto de reagente comercial<sup>9</sup> sem qualquer tipo de

---

<sup>7</sup> Agulha de coleta a vácuo 25x8 - BD

<sup>8</sup> Tubo vacutainer SST 6ml Hemogard - BD

extração química ou processo de purificação, tendo como elemento radioativo traçador o iodo<sup>125</sup>. As etapas utilizadas no procedimento são listadas abaixo:

- Descongelamento dos soros sangüíneos que, assim como os reagentes, somente foram utilizados após atingirem a temperatura ambiente.
- Identificação de quatro tubos de polipropileno (12x75mm) não revestidos, sendo dois como T (contagem total) e dois como NSB (ligação não-específica).
- Identificação de tubos de polipropileno (12x75mm) revestidos com anticorpos anti-T<sub>3</sub> total, sendo todos os calibradores realizados em duplicatas. O seguinte protocolo foi estabelecido:

| <b>Calibradores</b> | <b>ng/dl</b> | <b>nmol/l</b> |
|---------------------|--------------|---------------|
| A                   | 0            | 0             |
| B                   | 20           | 0,31          |
| C                   | 50           | 0,77          |
| D                   | 100          | 1,54          |
| E                   | 200          | 3,07          |
| F                   | 600          | 9,22          |

- Identificação de um tubo de polipropileno, revestido com anticorpos anti-T<sub>3</sub> total, para cada amostra desconhecida.
- Preparação de um "pool" a partir de alíquotas de amostras de soro diferentes de diferentes gatos.
- Tubos de polipropileno revestidos com anticorpos anti-T<sub>3</sub> total foram identificados como "pool". Os tubos "pool" foram distribuídos antes da primeira amostra de soro dos animais e seguidamente após um intervalo de trinta amostras.
- Transferência de 100µl do calibrador A para cada tubo NSB e A.
- Transferência de 100µl de cada um dos calibradores B, C, D, E, F, para os correspondentes tubos de polipropileno.

- Transferência de 100µl de cada soro a ser analisado para os tubos correspondentes de polipropileno.
- Transferência de 100µl do "pool" para os tubos correspondentes, sendo utilizado o mesmo "pool" em todos os momentos, objetivando a determinação dos erros intra-ensaio e inter-ensaio.
- Adição em todos os tubos 1000µl de T<sub>3</sub> total marcado com I<sup>125</sup>.
- Homogeneização de todos os tubos com o auxílio de um agitador de tubos<sup>10</sup>, não ultrapassando um prazo máximo de 10 minutos após a adição do traçador.
- Incubação dos tubos a 37°C em banho-maria por um período de duas horas.
- Passado o tempo de reação, com exceção dos tubos T, todos os demais foram decantados. Os resíduos aderidos à parede interna dos tubos foram delicadamente retirados com papel filtro, tendo-se o cuidado de não entrar em contato com a parte revestida.
- As mensurações de radioatividade foram obtidas pela utilização de um contador gama automático<sup>11</sup>, com 48 poços, calibrados automaticamente para I<sup>125</sup> com o tempo de contagem de um minuto.
- Os valores das dosagens hormonais foram obtidos automaticamente com o uso de um programa específico de computador, acoplado ao contador gama e à impressora (Figura 1).

#### DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE T<sub>4</sub> LIVRE

A determinação dos valores séricos de T<sub>4</sub> livre ocorreu pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida. Utilizou-se para isto um conjunto de reagente comercial<sup>12</sup> sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, tendo como elemento radioativo o I<sup>125</sup>. Foram adotadas as seguintes etapas para a realização das dosagens:

- Descongelamento dos soros sangüíneos que, assim como os reagentes, somente foram utilizados após atingirem a temperatura ambiente.

---

<sup>10</sup> Phoenix®

<sup>11</sup> KinetiCount®, Vitek Systems, Missouri, USA.

<sup>12</sup> Coat a Count® Free T<sub>4</sub>, Diagnostic Products Co., Los Angeles, C.A., USA.

- Identificação de quatro tubos de polipropileno (12x75mm) não revestidos, sendo dois como T (contagem total) e dois como NSB (ligação não específica).
- Identificação de tubos de polipropileno (12x75mm) revestidos com anticorpos anti-T<sub>4</sub> livre, sendo todos os calibradores realizados em duplicatas. O seguinte protocolo foi estabelecido:

| Calibradores | ng/dl | nmol/l |
|--------------|-------|--------|
| A            | 0     | 0      |
| B            | 0,1   | 1,3    |
| C            | 0,5   | 6,4    |
| D            | 1,3   | 16,7   |
| E            | 2,2   | 28,3   |
| F            | 4,8   | 61,8   |
| G            | 10    | 128,7  |

- Identificação de um tubo de polipropileno, revestido com anticorpos anti-T<sub>4</sub> livre, para cada amostra.
- Preparação de um "pool" a partir de alíquotas de amostras de soro diferentes de diferentes gatos.
- Tubos de polipropileno revestidos com anticorpos anti-T<sub>4</sub> livre foram identificados como "pool". Os tubos "pool" foram distribuídos antes da primeira amostra de soro dos animais e seguidamente após um intervalo de trinta amostras.
- Transferência de 50µl do calibrador A para cada tubo NSB e A.
- Transferência de 50µl de cada um dos calibradores B, C, D, E, F, para os correspondentes tubos de polipropileno.
- Transferência de 50µl de cada soro a ser analisado para os tubos correspondente de polipropileno.

- Transferência de 50µl do "pool" para os tubos correspondentes, sendo utilizado o mesmo "pool" em todos os momentos, objetivando a determinação dos erros intra-ensaio e inter-ensaio.
- Adição em todos os tubos 1000µl de T<sub>3</sub> livre marcado com I<sup>125</sup>.
- Homogeneização de todos os tubos com o auxílio de um agitador de tubos<sup>13</sup>, não ultrapassando um prazo máximo de 10 minutos após a adição do traçador.
- Incubação dos tubos a 37°C em banho-maria por um período de uma hora.
- Passado o tempo de reação, com exceção dos tubos T, todos os demais foram decantados. Os resíduos aderidos à parede interna dos tubos foram delicadamente retirados com papel filtro, tendo-se o cuidado de não entrar em contato com a parte revestida.
- As mensurações de radioatividade foram obtidas pela utilização de um contador gama automático<sup>14</sup>, com 48 poços, calibrados automaticamente para I<sup>125</sup> com o tempo de contagem de um minuto.
- Os valores das dosagens hormonais foram obtidos automaticamente com o uso de um programa específico de computador, acoplados ao contador gama e à impressora (Figura 1).

## DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE T<sub>4</sub> TOTAL

Os valores de T<sub>4</sub> total sérico também foram determinados pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida. Utilizou-se para isto um conjunto de reagente comercial<sup>15</sup> sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, tendo como elemento radioativo o I<sup>125</sup>. Foram realizadas as seguintes etapas no procedimento:

- Descongelamento dos soros sangüíneos que, assim como os reagentes, somente foram utilizados após atingirem a temperatura ambiente.

---

<sup>13</sup> Phoenix®

<sup>14</sup> KinetiCount®, Vitek Systems, Missouri, USA.

<sup>15</sup> Coat a Count® Total T<sub>4</sub>, Diagnostic Products Co., Los Angeles, C.A., USA.

- Identificação de quatro tubos de polipropileno (12x75mm) não revestidos, sendo dois como T (contagem total) e dois como NSB (ligação não específica).
- Identificação de tubos de polipropileno (12x75mm) revestidos com anticorpos anti-T<sub>4</sub> total, sendo todos os calibradores realizados em duplicatas. O seguinte protocolo foi estabelecido:

| Calibradores | µg/dl | nmol/l |
|--------------|-------|--------|
| A            | 0     | 0      |
| B            | 1     | 12,9   |
| C            | 4     | 51,5   |
| D            | 10    | 129    |
| E            | 16    | 206    |
| F            | 24    | 309    |

- Identificação de um tubo de polipropileno, revestido com anticorpos anti-T<sub>4</sub> total, para cada amostra desconhecida.
- Preparação de um "pool" a partir de alíquotas de amostras de soro diferentes de diferentes gatos.
- Tubos de polipropileno revestidos com anticorpos anti-T<sub>4</sub> total foram identificados como "pool". Os tubos "pool" foram distribuídos antes da primeira amostra de soro dos animais e seguidamente após um intervalo de trinta amostras.
- Transferência de 25µl do calibrador A para cada tubo NSB e A.
- Transferência de 25µl de cada um dos calibradores B, C, D, E, F, para os correspondentes tubos de polipropileno.
- Transferência de 25µl de cada soro a ser analisado para os tubos correspondente de polipropileno.
- Transferência de 25µl do "pool" para os tubos correspondentes, sendo utilizado o mesmo "pool" em todos os momentos, objetivando a determinação dos erros intra-ensaio e inter-ensaio.

- Adição em todos os tubos 1000µl de T<sub>4</sub> total marcado com I<sup>125</sup>.
- Homogeneização de todos os tubos com o auxílio de um agitador de tubos<sup>16</sup>, não ultrapassando um prazo máximo de 10 minutos após a adição do traçador.
- Incubação dos tubos a 37°C em banho-maria por um período de duas horas.
- Passado o tempo de reação, com exceção dos tubos T, todos os demais foram decantados. Os resíduos aderidos à parede interna dos tubos foram delicadamente retirados com papel filtro, tendo-se o cuidado de não entrar em contato com a parte revestida.
- As mensurações de radioatividade foram obtidas pela utilização de um contador gama automático<sup>17</sup>, com 48 poços, calibrados automaticamente para I<sup>125</sup> com o tempo de contagem de um minuto.
- Os valores das dosagens hormonais foram obtidos automaticamente com o uso de um programa específico de computador, acoplados ao contador gama e à impressora (Figura 1).

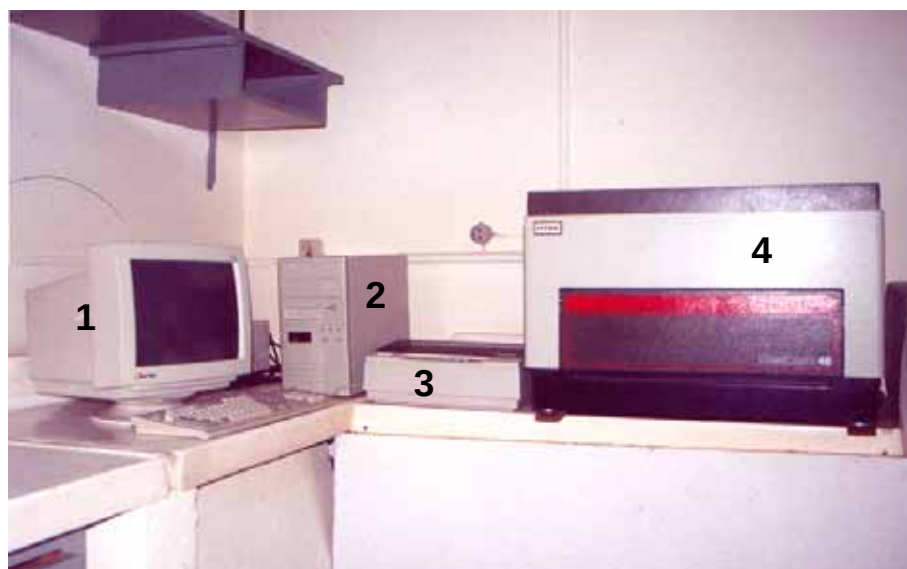


Figura 1: Equipamentos utilizados para dosagem hormonal (RIA). 1- monitor, 2- microcomputador, 3- impressora, 4- contador gama automático.

---

<sup>18</sup> - Phoenix®

<sup>17</sup> KinetiCount®, Vitek Systems, Missouri, USA.

## **METODOLOGIA DETALHADA PARA REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES DENSITOMÉTRICAS:**

A mensuração da densidade mineral óssea dos animais utilizados no experimento foi realizada, em todos os momentos, pela técnica de densitometria óptica radiográfica no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

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 radiográficos<sup>18</sup> e chasis 18x24cm equipados com écrans de terras raras. Paralelamente e distante 3 cm 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 (Figura 2). 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 225mm<sup>2</sup>.

O aparelho de raios-X<sup>19</sup> utilizado foi calibrado a uma distância foco-filme de 90 cm 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

---

<sup>20</sup> Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda.

<sup>19</sup> TUR D 800, 500 Ma.

término do experimento. Para os processos de revelação<sup>20</sup> e fixação<sup>21</sup> do filme radiográfico, foi utilizada uma processadora automática padrão<sup>22</sup>.

Após a obtenção das imagens radiográficas, que foram digitalizadas, utilizou-se um Scanner HP Scanjet 4C, com um adaptador para transparência HP Scanjet 4C. Uma vez digitalizadas, utilizando-se o programa HP Deskscan, as imagens foram armazenadas em um disco removível de zip 100 MB ou microcomputador.

Utilizando-se um programa computacional (Software)<sup>23</sup> 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 utilizadas 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

---

<sup>20</sup> Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda.

<sup>21</sup> Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda.

<sup>22</sup> Macrotec.

<sup>23</sup> Athenas – Sistema de Inteligência Avançada – São José dos Campos

obtida anteriormente. Por último, aumentaram-se mais 4 mm 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.

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.



Figura 2: Suporte de madeira acoplado à escala de Alumínio ("phantom").

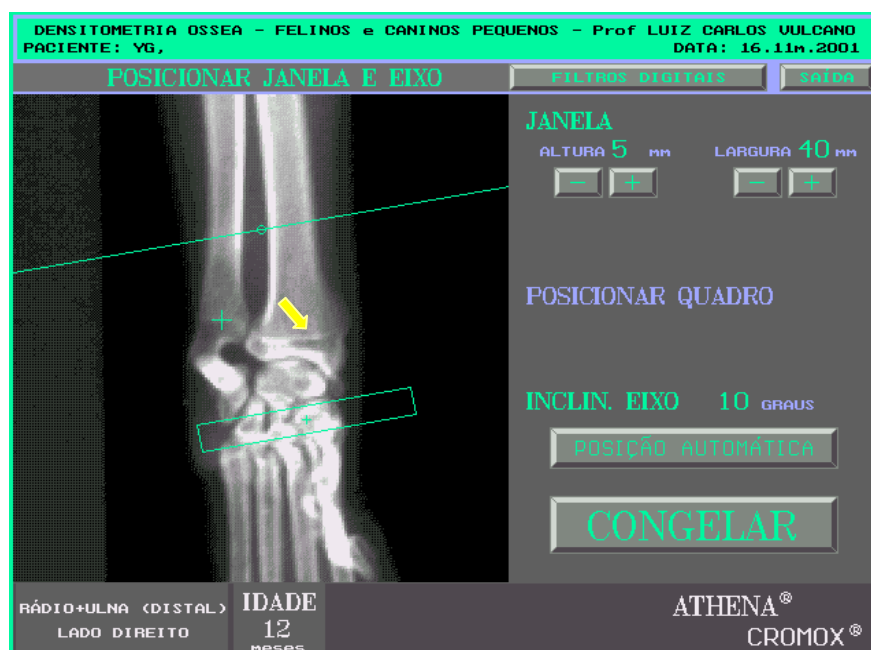


Figura 3: Identificação da cicatriz epifisária da extremidade distal do rádio direito (seta).



Figura 4: Posicionamento do eixo sobre a cicatriz epifisária.

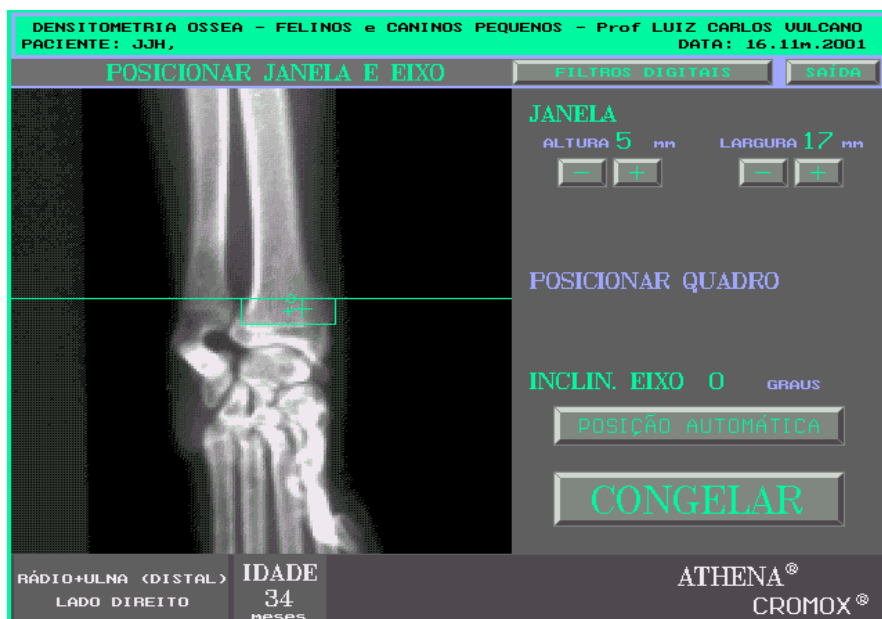


Figura 5: Marcação de uma reta localizada 5mm acima da cicatriz epifisária do rádio, sendo referência para a seleção da região a ser feita a densitometria.

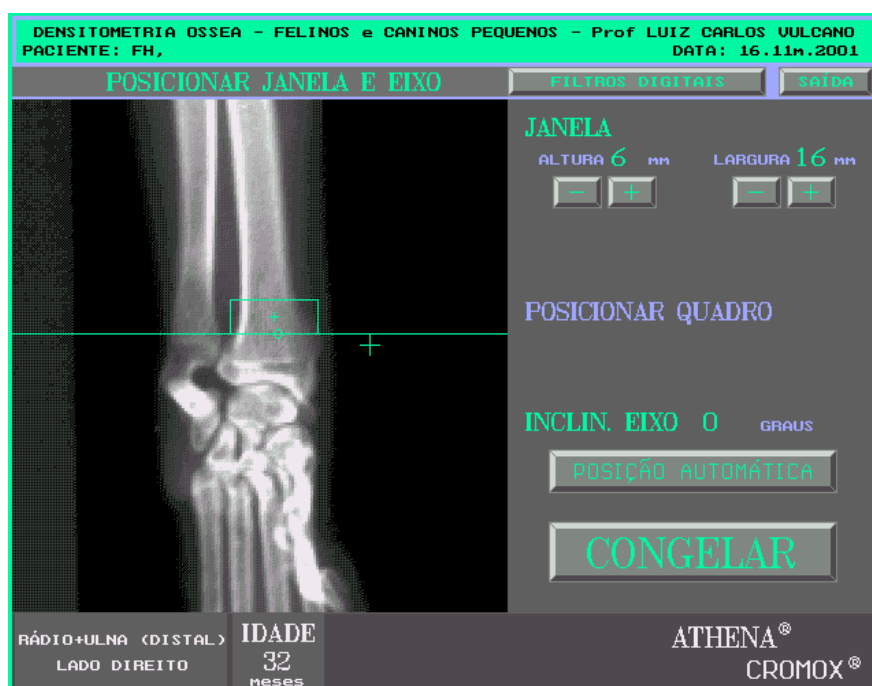


Figura 6: Delimitação da região a ser feita a densitometria.

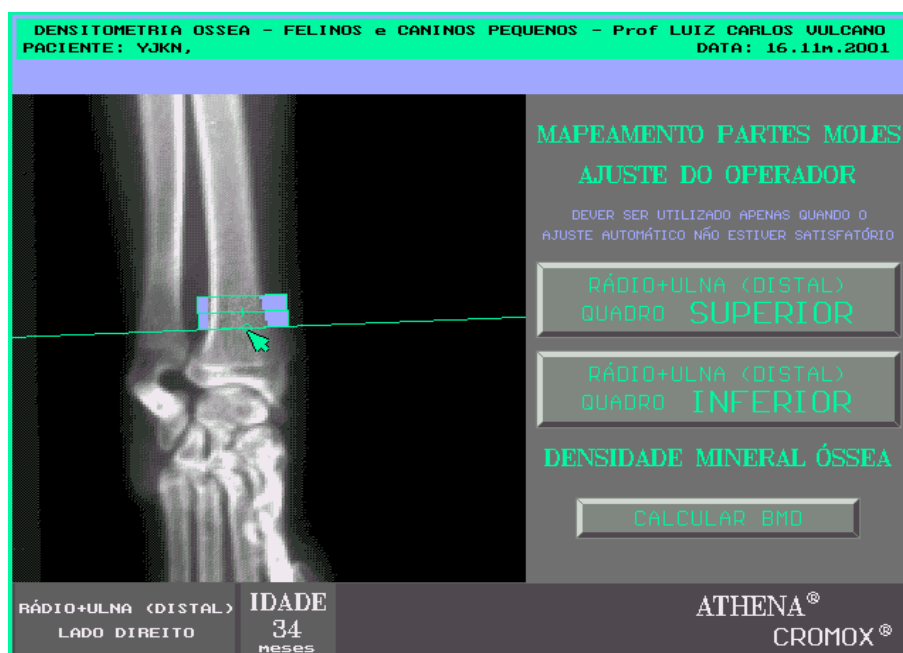


Figura 7: Mapeamento das partes moles adjacentes ao tecido ósseo.

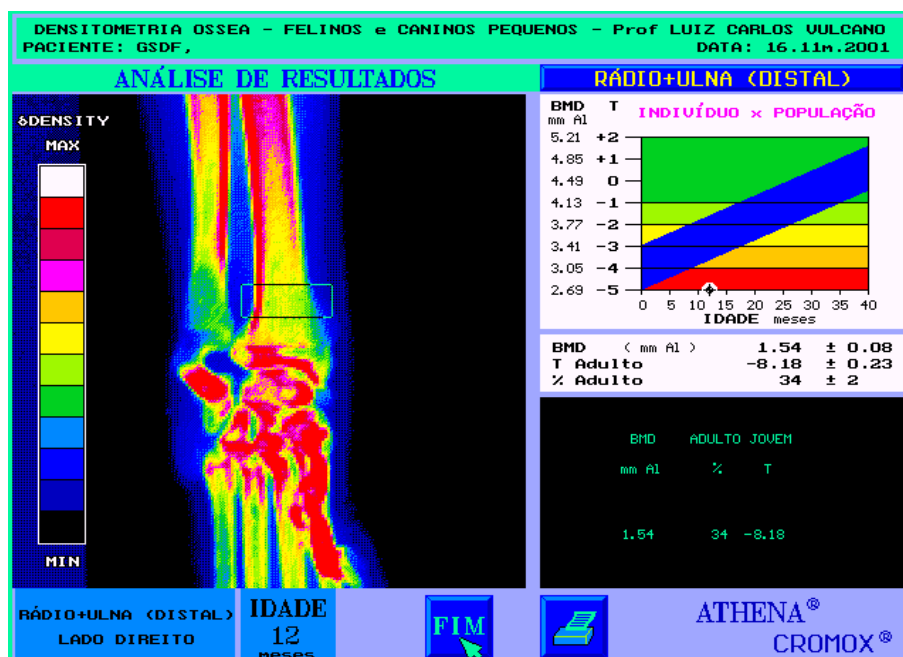


Figura 8: Cálculo da densidade mineral óssea, a partir da região selecionada.

## METODOLOGIA DETALHADA PARA A AVALIAÇÃO SÉRICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ -2 E -9 E ISOENZIMAS DA FOSFATASE ALCALINA

A avaliação das metaloproteínases de matriz e isoenzimas da fosfatase alcalina foram realizadas no Departamento de Morfologia e no Departamento de Física e Biofísica, ambos localizados no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

Tabela 1- Fórmula utilizada para a preparação do gel de separação para realização de zimografia de proteínas.

| <b>Componentes</b>           | <b>Volume</b> |
|------------------------------|---------------|
| Água deionizada              | 3,7ml         |
| Gelatina 1%                  | 1,0ml         |
| Bis/Acrilamida 30%           | 2,7ml         |
| Tampão 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 | 2,5ml         |
| SDS 10%                      | 100µl         |
| APS                          | 50µl          |
| Temed                        | 5µl           |

Tabela 2- Fórmula utilizada para a preparação do gel de separação para realização de eletroforese.

| <b>Componentes</b>           | <b>Volume</b> |
|------------------------------|---------------|
| Água deionizada              | 4,7ml         |
| Bis/Acrilamida 30/08         | 2,7ml         |
| Tampão 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 | 2,5ml         |
| SDS 10%                      | 100µl         |
| APS                          | 50µl          |
| Temed                        | 5µl           |

Tabela 3- Fórmula utilizada para a preparação do gel de empilhamento para realização de zimografia de proteínas e eletroforese.

| Componentes                  | Volume |
|------------------------------|--------|
| Água deionizada              | 3,0ml  |
| Bis/Acrilamida 30/08         | 650µl  |
| Tampão 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 | 1,25ml |
| SDS 10%                      | 50µl   |
| APS                          | 25µl   |
| Temed                        | 5µl    |

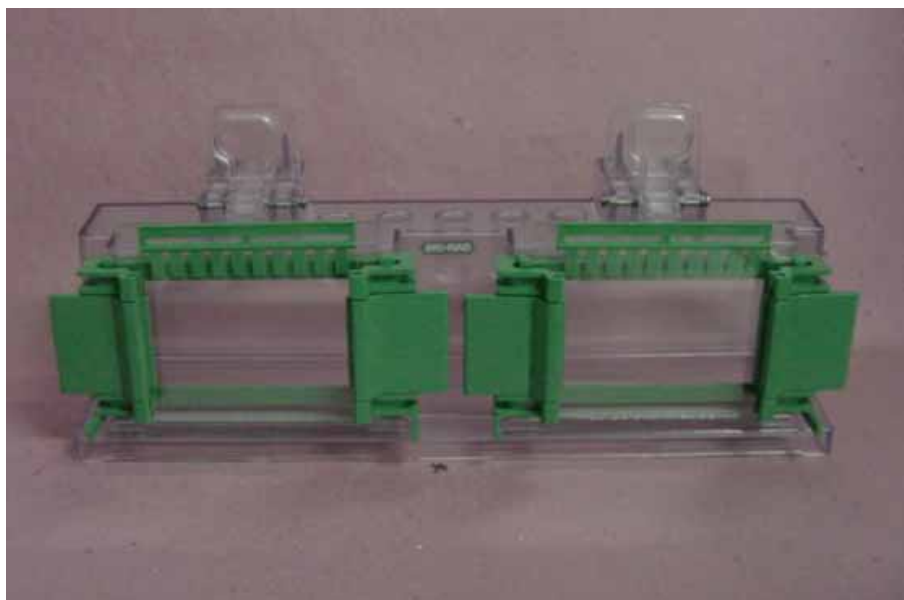


Figura 9: Suportes para preparação do gel de poliacrilamida para posterior realização de eletroforese e zimografia de proteínas (Mini Protean II).



Figura 10: Materiais para eletroforese sob condições não-redutoras. Cuba - Mini Protean® (esquerda) e fonte (direita)



Figura 11: Microcomputador com o programa computacional Image Master VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

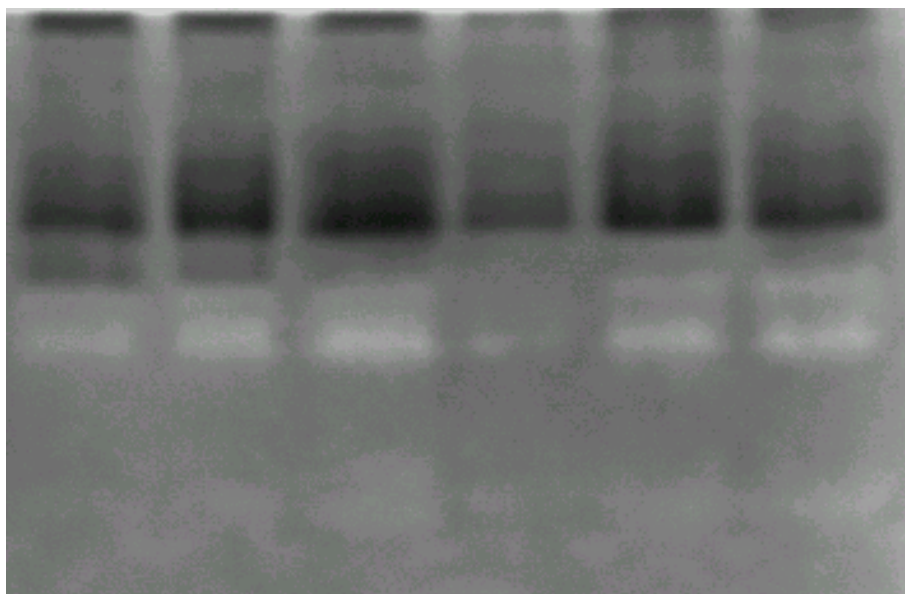


Figura 12: Zimografia do soro de gatos com tirotoxicose induzida sem incubação com  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$ , demonstrando perda da atividade gelatinolítica das metaloproteinases de matriz -2 e -9.

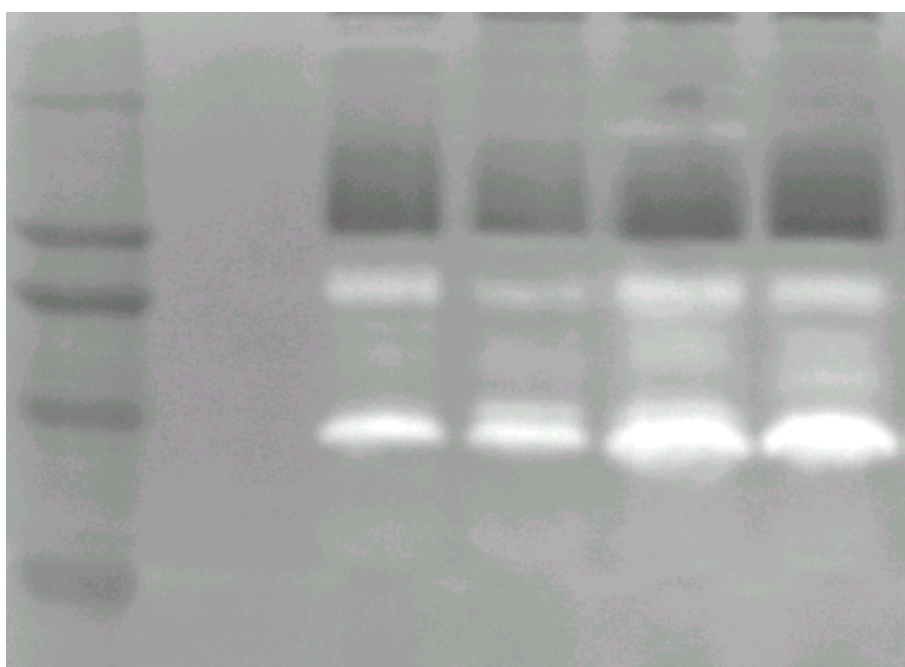


Figura 13: Gel após incubação com  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$  e corados com Coomassie Brilliant Blue 0,25%, demonstrando bandas claras indicativas de proteólise em um fundo escuro.

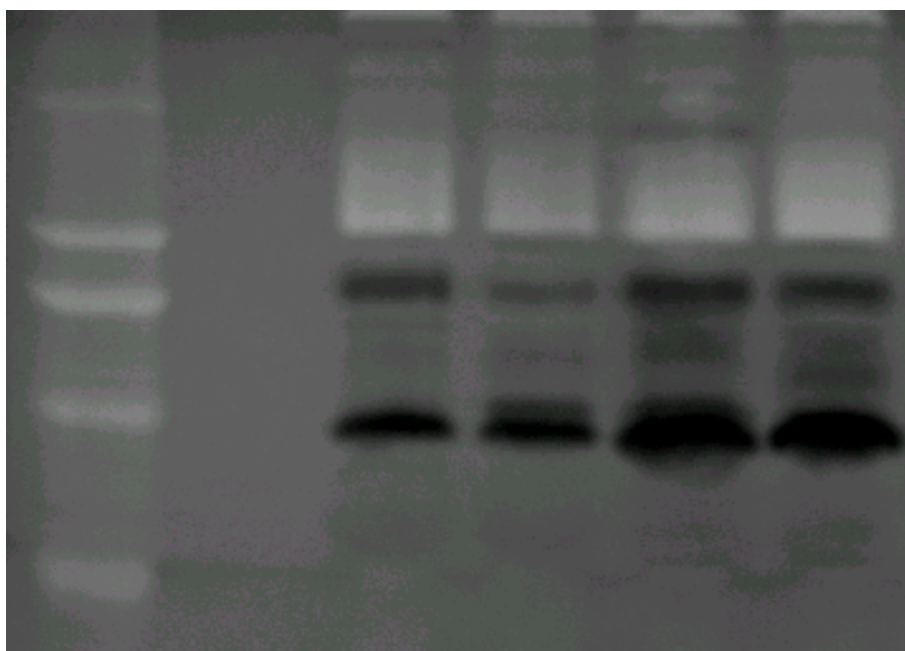


Figura 14: Conversão das imagens obtidas na zimografia em bandas escuras sobre um fundo claro, possibilitando melhor análise densitométrica.

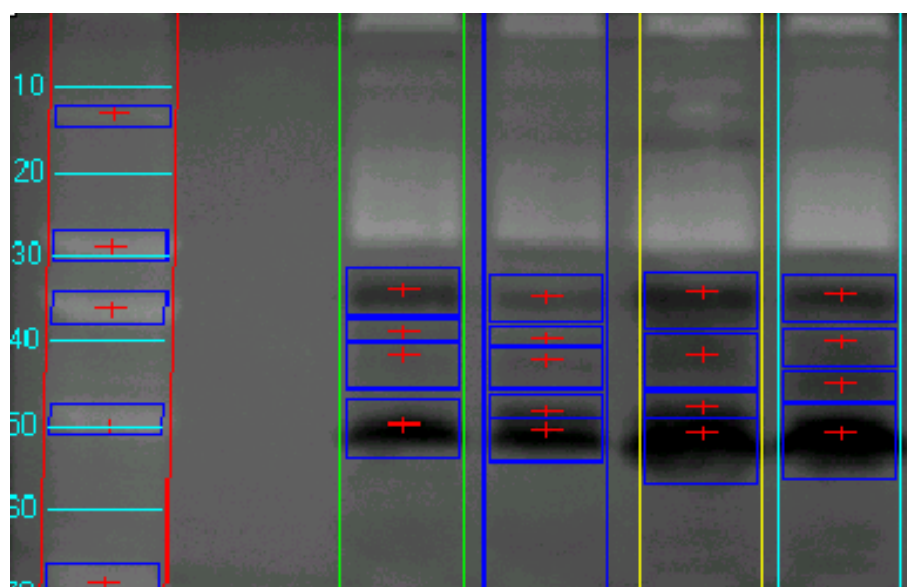


Figura 15: Seleção das linhas e bandas de proteínas obtidas na zimografia para determinação da densidade óptica integrada.

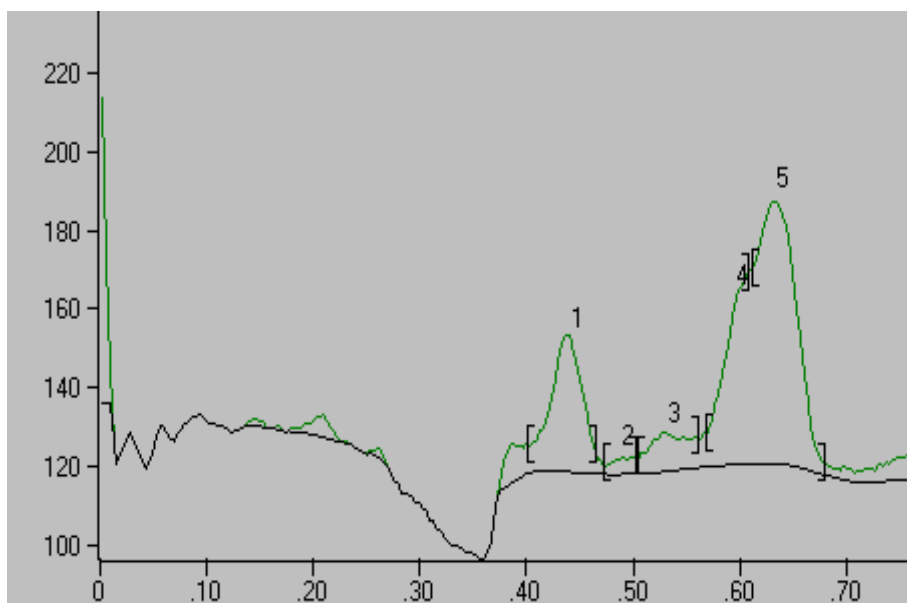


Figura 16: Gráfico demonstrando a densidade óptica integrada das bandas de proteína com atividade gelatinolítica no soro de gato com tirotoxicose induzida. Valores de peso molecular determinados por RF.

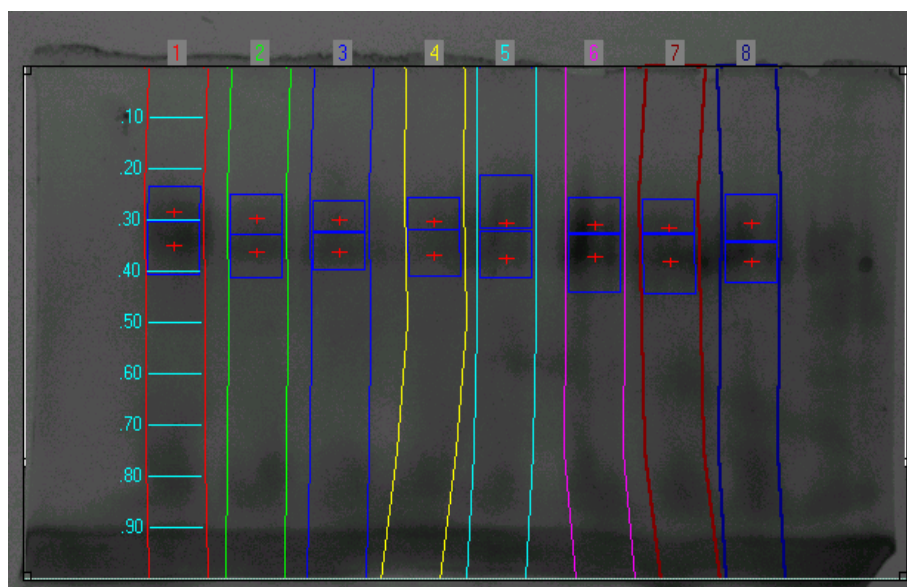


Figura 17: Seleção das linhas e bandas obtidas após eletroforese para caracterização das isoenzimas da fosfatase alcalina em gatos com tirotoxicose induzida.

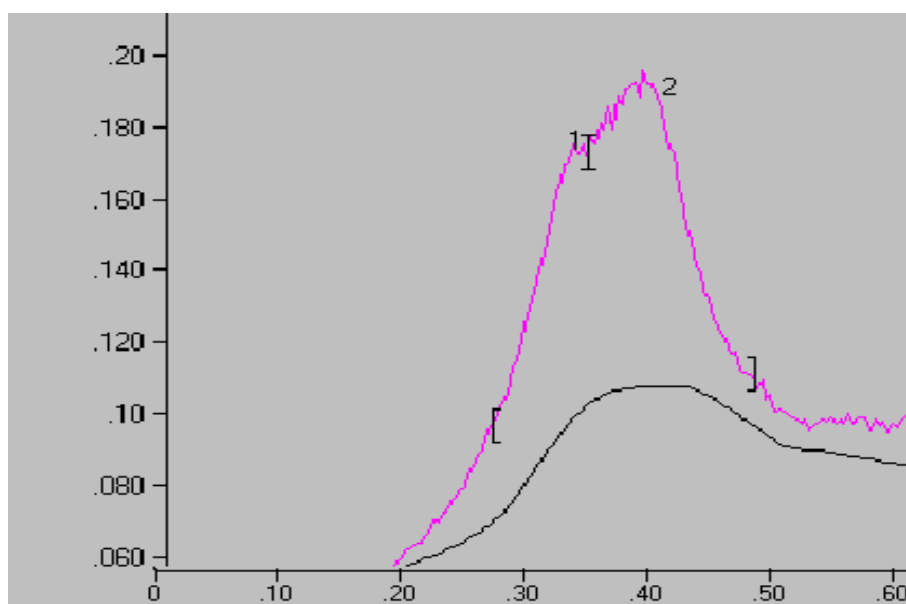


Figura 18: Gráfico demonstrando a densidade óptica integrada das bandas de fosfatase alcalina de origem hepática (1) e óssea (2) no soro de gatos com tirotoxicose induzida.