

“Función tiroidea normal e hipofunción
en caninos: influencia del género, la
edad y la raza. Rangos de referencia
para el diagnóstico hormonal
de hipotiroidismo”

Tesis de Maestría en Salud Animal

Dra. Matilde Canedo Pérez

Directora de Tesis: Dra. Ana Paula Pessina

Co-Director de Tesis: Dr. Víctor Castillo

Orientación: Salud Animal

“An incorrect diagnosis of hypothyroidism is the most common reason for treatment failure”.

J.C. Scott-Moncrieff

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por todo lo que me han dado, espero algún día poder retribuírselo, gracias por ser mi familia. A mi hermana Inés, por ser mi espejo eterno, mi tribu intoku te adoro. Agradezco a mis amigas del alma por siempre haber confiado en mí, escuchándome y apoyándome a lo largo de este proceso. A Val por haberme enseñado que nuestra sensibilidad es nuestra fuerza. Agradezco de corazón a mi tutora, Paula, por su humildad, paciencia y esfuerzo a la hora de guiarme, crecí mucho a tu lado. A Ana, gracias por mostrarme la importancia de defender los sueños con tenacidad y esfuerzo, sin descuidar el lado humano. Agradezco también a mi cotutor, Víctor, por el tiempo compartido y su humildad a la hora de aconsejarme. A Elsa Garófalo por sus correcciones y guía, muchas gracias. Al grupo del LEMA: Isa, Clau, Andre G., Sofi, Ro, Vicky, Andre F. y Gretel, gracias por ayudarme con cariño a lo largo de todo este camino y alegrar mi día a día con su sola presencia. Una de las mejores partes de este proceso fue conocerlas. A Rosa, María, Nariné, Rodi y Eugenio por convertir el espacio de trabajo en un lugar ameno y divertido. Agradezco a Nacho Alcántara, que con su paciencia y vocación docente me guió en el análisis de resultados, desinteresadamente. A Silvana, Sofi B. y Silvina por ayudarme y enseñarme, gracias por hacer que algunas partes de este camino fueran menos solitarias. A los criadores y colegas que me abrieron la puerta de sus veterinarias, establecimientos y hogares poniendo a disposición sus preciadas mascotas con cariño y buena disposición. Muchas gracias, esto siempre fue por y para ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	iii
2. SUMMARY.....	v
3. INTRODUCCIÓN.....	1
4. ANTECEDENTES.....	4
4.I. La glándula tiroides.....	4
4.I.1. Anatomía.....	4
4.I.2. Histología.....	5
4.I.3. Síntesis y secreción de hormonas tiroideas.....	6
4.I.4. Regulación de la función tiroidea (eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo).....	7
4.II. Hipotiroidismo en caninos.....	9
4.II.1. Definición y características generales del hipotiroidismo.....	9
4.II.2. Epidemiología.....	9
4.II.3. Origen y causas del hipotiroidismo.....	10
4.II.4. Signos clínicos del Hipotiroidismo.....	12
4.II.5. Diagnóstico del hipotiroidismo.....	13
4.II.6. Tratamiento del hipotiroidismo.....	26
4.II.7. Monitoreo del tratamiento.....	26
4.II.8. Pronóstico de la enfermedad.....	27
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
6. HIPÓTESIS.....	30
7. OBJETIVOS.....	30
7.I. General.....	30
7.II. Específicos.....	30

7.II.1. Objetivo específico 1 A.....	30
7.II.2. Objetivo específico 1 B.....	30
7.II.3. Objetivo específico 2.....	31
7.II.4. Objetivo específico 3.....	31
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
8.I. Objetivo específico 1 A.....	32
8.II. Objetivo específico 1 B.....	35
8.III. Objetivo específico 2.....	36
8.IV. Objetivo específico 3.....	37
9. RESULTADOS.....	40
9.I. Resultados Objetivo específico 1A.....	40
9.II. Resultados Objetivo específico 1B.....	41
9.III. Resultados Objetivo específico 2.....	43
9.IV. Resultados Objetivo específico 3.....	45
10. DISCUSIÓN.....	52
11. CONCLUSIONES.....	63
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
13. ANEXO I.....	85
14. ANEXO II.....	98
15. ANEXO III.....	100

1. RESUMEN

Esta tesis tuvo por finalidad determinar los rangos de normalidad de las hormonas (T4T, T4L y TSH) y metabolitos (colesterol y triglicéridos) utilizados para el diagnóstico de hipotiroidismo canino. Además se evaluó si factores como género, edad, talla y raza afectan las variables mencionadas. Se seleccionaron 270 caninos sanos, machos y hembras intactos, de razas puras y mestizos; los cuales se clasificaron acorde al género, la edad, la talla y la raza. Las hembras presentaron mayores concentraciones de hormonas tiroideas (T4T y T4L) que los machos ($P=0.043$ y $P=0.0017$ respectivamente). Los cachorros de 3 meses a 1 año de edad presentaron mayores niveles de T4T y T4L en comparación con caninos adultos de 1 a 5 años ($P=0.0012$ y $P=0.0001$ respectivamente); y de 5 a 10 años ($P=0.005$ y $P< 0.001$ respectivamente). Los niveles séricos de TSH aumentaron con la edad, encontrando diferencias únicamente entre los cachorros de 3 meses a 1 año y adultos de 5 a 10 años ($P=0.015$). Las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos no difirieron con el género, la edad o la talla de los caninos. El efecto de la raza se estudió únicamente para las razas Bulldog Inglés ($n=20$) y Bulldog Francés ($n=17$); machos y hembras intactos. Los perros de raza Bulldog (francés e inglés) presentaron niveles séricos de T4T y T4L más altos que los grupos control (pastores alemanes y mestizos). Los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y TSH no se vieron afectados por la raza o el género. Por otro lado esta tesis permitió establecer intervalos de referencia específicos acorde al género y a la edad de los caninos. Se comparó si utilizando los intervalos de referencia generados (IRE), la proporción de caninos diagnosticados hipotiroideos se modificaba al compararla con la obtenida mediante el intervalo de referencia único (IRI). El uso de los IRE evidenció un descenso del 50% en la proporción de caninos adultos confirmados mediante la determinación de T4T para cada categoría etaria (IRI vs IRE); exceptuando los cachorros de 3 meses a 1 año. El uso de los IRI para T4T mostró una mayor proporción de machos confirmados que de hembras, mientras que al utilizar los IRE se igualó la proporción entre ambos. Existió un aumento del 9% en la proporción de caninos adultos confirmados mediante TSH (IRI vs IRE) aumentando para cada categoría etaria. La proporción de caninos confirmados mediante la determinación conjunta de T4T y TSH fue menor que la obtenida para cada hormona por separado, al utilizar ambos intervalos (IRI e IRE). En suma, factores como el género y/o la edad afectan las concentraciones de T4T y TSH, debiendo ser consideradas al momento de realizar el diagnóstico endócrino de hipotiroidismo canino

mediante estas hormonas. El uso de intervalos específicos que contemplen estas variables permite una aproximación diagnóstica más certera para dicha endocrinopatía.

2. SUMMARY

The purpose of this thesis was to determine the reference intervals of the hormones (TT4, FT4 and TSH) and metabolites (cholesterol and triglycerides) used for the diagnosis of canine hypothyroidism. In addition, it was evaluated whether factors such as gender, age, height and breed affect the aforementioned variables. We selected 270 healthy canines, intact males and females, purebred and mongrel; which were classified according to gender, age, breed-size and breed. The females presented higher concentrations of thyroid hormones (TT4 and FT4) than the males ($P = 0.043$ and $P = 0.0017$ respectively). Puppies from 3 months to 1 year of age had higher levels of TT4 and FT4 compared to adult canines from 1 to 5 years old ($P = 0.0012$ and $P = 0.0001$ respectively); and from 5 to 10 years old ($P = 0.005$ and $P < 0.001$ respectively). Serum TSH levels increased with age, finding differences only between puppies from 3 months to 1 year and adults from 5 to 10 years ($P = 0.015$). The serum concentrations of cholesterol and triglycerides did not differ with gender, age or size of the canines. The effect of the breed was studied only for the English Bulldog breed ($n = 20$) and French Bulldog ($n = 17$); intact males and females. Dogs of the Bulldog breed (French and English) had higher serum TT4 and FT4 levels than the control groups (German shepherd and mongrel). Serum levels of cholesterol, triglycerides and TSH were not affected by breed or gender. On the other hand, this thesis allowed the establishment of specific reference intervals according to the gender and age of the dogs. It was compared if using the generated reference intervals (IRE), the proportion of diagnosed hypothyroid canines was modified when compared to that obtained by the single reference interval (IRI). The use of IREs showed a 50% decrease in the proportion of adult canines confirmed by the determination of TT4 for each age group (IRI vs IRE); except for puppies from 3 months to 1 year old. The use of the IRI for TT4 showed a higher proportion of confirmed males than of females, whereas when using the IRE the proportion between both was equalized. There was a 9% increase in the proportion of adult canines confirmed by TSH (IRI vs IRE), increasing for each age category. The proportion of canines confirmed by the joint determination of TT4 and TSH was lower than that obtained for each hormone separately, using both intervals (IRI or IRE). In

sum, factors such as gender and/or age affect the concentrations of TT4 and TSH, and should be considered at the time of performing the endocrine diagnosis of canine hypothyroidism using these hormones. The use of specific intervals that contemplate these variables allows a more accurate diagnostic approach for this endocrinopathy.

1. INTRODUCCIÓN

El hipotiroidismo es una de las enfermedades endócrinas más frecuentes en caninos, pero también una de las más sobrevaloradas en la clínica veterinaria (Feldman y Nelson, 2007). Esta dificultad diagnóstica surge como consecuencia de la ausencia de un solo test que confirme la enfermedad, de la variedad de presentaciones clínicas y de la existencia de factores que pueden hacer variar los parámetros endócrino-metabólicos obtenidos y así contribuir a una interpretación errónea de los resultados (Coppo y col., 2003; Pasquini y col., 2008; Scott-Moncrieff y col., 2012; Hegstad-Davies y col., 2015). La única base certera para el diagnóstico definitivo del hipotiroidismo es la determinación en plasma de hormonas tiroideas junto con la determinación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Ferguson, 1994; Kempainen y Behrend, 2001; Hoh y Oh, 2006). Asimismo, la determinación del perfil lipídico es una herramienta útil en el diagnóstico de esta endocrinopatía ya que la hiperlipidemia se evidencia en un 75% de los caninos hipotiroideos (Feldman y Nelson, 2007). No existe una prueba de laboratorio con una sensibilidad y especificidad perfecta. Los estudios clínicos demostraron que la TSH sérica tiene alta especificidad (90 % o mayor) cuando se emplea para el diagnóstico de hipotiroidismo canino, en tanto su valor sea interpretado en concierto con la concentración sérica de Tiroxina total (T4T) o Tiroxina libre (T4L) y la sintomatología clínica (Ramsey y col., 1997; Peterson y col., 1997; Dixon y col., 1999). Una baja concentración sérica de T4T o T4L con un nivel de TSH elevado, en una muestra de sangre obtenida en un perro con antecedentes y signos clínicos apropiados sostienen el diagnóstico de hipotiroidismo primario (Feldman y Nelson, 2007).

En perros los niveles séricos de las hormonas y metabolitos empleados en el diagnóstico de hipotiroidismo canino pueden variar no sólo por la presencia de la patología tiroidea, sino por factores fisiológicos como la edad, el género, la talla y la raza (Reimers y col., 1990; Gaughan y Bruyette, 2001). Numerosos estudios describen que a medida que la edad aumenta, las concentraciones de T4T y T4L disminuyen (Ramírez y Osorio, 2009; Shiel y col., 2010; Scott-Moncrieff y col., 2012; Hegstad-Davies y col., 2015), y los niveles de TSH aumentan (Bhatti y col., 2006; Fialkovicová y col., 2012; Hegstad-Davies y col., 2015). Mientras que para el colesterol y triglicéridos las variaciones por edad están dadas por mayores concentraciones séricas en

neonatos y cachorros en relación a otras categorías etarias (Wright-Rodgers y col., 2005; Pasquini y col., 2008). En cuanto al género si bien la información es contradictoria, varios autores reportan que la concentración sérica de T4T y T4L, es mayor en hembras que en machos (Reimers y col., 1984; Shiel y col., 2010; Pessina y col., 2014; Hegstad-Davies y col., 2015). Mientras que para TSH no se encuentran diferencias entre géneros (Shiel y col., 2010; Hegstad-Davies y col., 2015). Con respecto a los niveles de colesterol y triglicéridos, la información es contradictoria, siendo mayores en hembras (Kaspar y Norris, 1977; Pasquini y col., 2008; Pessina y col., 2009; 2010; 2014) o no observándose diferencias entre géneros (Downs y col., 1993; Coppo y col., 2003; Osorio, 2006; Osorio, 2008). Además existen caninos de razas como la Greyhound que tiene una concentración de T4T y T4L significativamente más baja que las demás razas (Gaughan y Bruyette, 2001; Shiel y col., 2007), así como los Basenjis, perros de trineo de Alaska, Sloughis, Whippet y Scottish Deerhounds que poseen valores de T4T o T4L ubicados por debajo o en el límite inferior del rango de referencia para estas hormonas (Lee y col., 2004; Van Geffen y col., 2006; Panakova y col., 2008; Seavers y col., 2008; Sheerer y col., 2013). Por otro lado el Samoyedo, Siberian Husky y Keeshond si bien presentan valores de T4T y T4L dentro del intervalo de referencia para la población canina general, presentan valores más altos para estas hormonas que otras razas caninas (Hegstad-Davies y col., 2015). En cuanto a las variaciones raciales en los valores de colesterol y triglicéridos, el Rotweiler y el Mastín de los Pirineos presentan mayores niveles de estos metabolitos que otras razas caninas (Downs y col., 1993); mientras que otros autores, si bien reconocen que existen razas de mayor riesgo para la hiperlipidemia (Wada y col., 1977; Hubert y col., 1987), no observan diferencias raciales (Pasquini y col., 2008). Para comprender mejor la implicancia de la raza en el diagnóstico del hipotiroidismo, tomaremos como ejemplo el Bulldog francés e inglés. Razas que a pesar de su gran popularidad (Sandøe y col., 2017), y sus dificultades reproductivas y dermatológicas (Wydooghe y col., 2013), han sido poco estudiadas para el hipotiroidismo. Es posible que estos animales, tengan valores hormonales fisiológicos diferentes de otras razas o de los intervalos de laboratorio no específicos.

En el diagnóstico endocrinológico de la función tiroidea, los valores obtenidos de los test hormonales se comparan con intervalos de referencia (IR) calculados para una población determinada y considerados normales si coinciden con un determinado intervalo preestablecido (Friedrichs y col., 2012). Cada laboratorio debe tener sus

propios valores de referencia para una población dada, ya que los valores de corte pueden diferir considerablemente entre regiones o países (Hubl y col., 2002). Los caninos con niveles fisiológicos de hormonas tiroideas, TSH colesterol y triglicéridos naturalmente más bajos o más altos podrían ser erróneamente diagnosticados si los resultados sanguíneos se interpretan sin tener en cuenta las características específicas del animal. Entonces, ¿no sería relevante, además de identificar los factores que pueden hacer variar los valores obtenidos en nuestra población, adaptar los intervalos de referencia a estas variaciones?

La presente tesis busca determinar si el género, la talla, la edad y la raza en caninos clínicamente sanos afectan las concentraciones séricas de las hormonas utilizadas para el diagnóstico de hipotiroidismo canino (T4T, T4L y TSH), así como colesterol y triglicéridos. Además busca definir intervalos de referencia para las hormonas y metabolitos mencionados, adaptándolos a estas variaciones fisiológicas. Por último se propone contrastar la proporción de animales confirmados para cada test diagnóstico y para cada intervalo de referencia (IRI vs IRE).

2. ANTECEDENTES

4.1. La glándula tiroides

4.1.1. Anatomía

En caninos, la glándula tiroides está formada por dos lóbulos simétricos, situados a ambos lados de la tráquea. El istmo que conecta los polos caudales de los lóbulos está presente muy ocasionalmente, principalmente en razas braquicéfalas (Miller y col., 1965) y razas grandes (Barone y Simoens, 2010). Los lóbulos tiroideos están cubiertos cada uno por los músculos esternocéfálico, esternohioideo y ventralmente por el músculo esternotiroideo. Las dimensiones y peso glandular son muy variables en función de la talla del perro y de su raza. La longitud de cada lóbulo varía de 1.10 a 5.20 cm, su ancho de 0.35 a 2.63 cm y su grosor de 0.15 a 1.60 cm. Su peso total oscila entre 0.65 y 25.30 gramos, representando aproximadamente 0.10 gr por kg del peso vivo (Barone y Simoens, 2010). En general, son los perros más jóvenes y de razas pequeñas (especialmente las braquicéfalas) los que presentan tiroides de mayor volumen (Miller y col., 1965). También ha sido reportado un mayor tamaño glandular en hembras que en machos, ocurriendo un agrandamiento transitorio y normal de la tiroides canina durante el estro y la preñez (Miller y col., 1965).

La tiroides es una glándula hipervascularizada, la mayor parte de su irrigación está dada por la arteria tiroidea anterior que proviene de una rama de la carótida común y la arteria tiroidea posterior que tiene origen en la arteria cefálica. El principal retorno venoso de la glándula está dado por la venas tiroideas craneal y caudal, que abandonan el borde caudal y craneal de cada lóbulo y se unen luego a la vena yugular interna (Evans y De Lahunta, 2013). La tiroides recibe fibras nerviosas derivadas del componente simpático (nervio simpático cervical) y parasimpático (nervio laríngeo superior y laríngeo recurrente, ambos procedentes del nervio vago). No hay evidencia que indique la existencia de nervios secretores en la tiroides (no habiendo terminaciones nerviosas en las células foliculares). Los fenómenos de secreción están indirectamente influidos, sin embargo, por un control estricto del flujo sanguíneo a través de la glándula en virtud de los abundantes plexos nerviosos en las paredes de las arterias (Evans y De Lahunta, 2013).

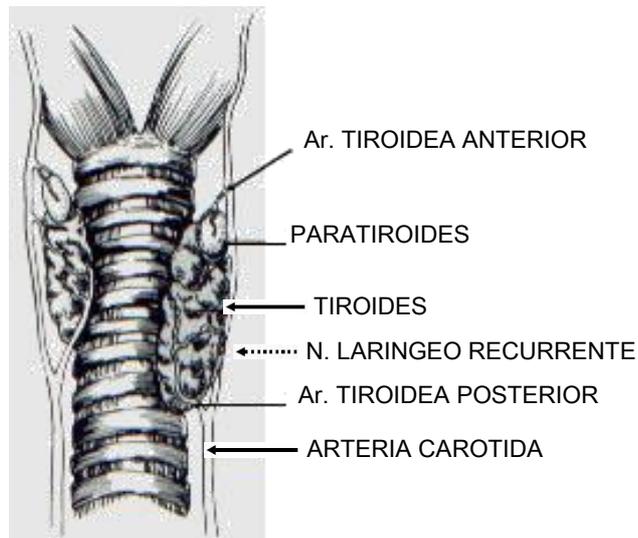


Figura 1. Anatomía de la glándula tiroides del perro. Fuente: Graves y col. (1994).

4.1.2. Histología

La glándula tiroides está envuelta por una cápsula conjuntiva de la cual nacen tabiques y trabéculas que constituyen la trama del parénquima glandular, y dividen a la glándula en pequeños lóbulos. El parénquima está constituido por innumerables folículos tiroideos, cada uno de los cuales representa una unidad estructural y funcional. Estos folículos son esféricos, su diámetro varía de 200 a 500 μm (Evans y De Lahunta, 2013) y contienen una sustancia coloidal derivada de la secreción de las células foliculares. El diámetro folicular, las características de sus células y su coloide varían según el estado funcional de la glándula. Los folículos en actividad son pequeños y las células de su pared tienen una forma columnar, mientras que los menos activos son grandes y sus células se vuelven bajas o cúbicas. El epitelio folicular está constituido por más de un 90% de células foliculares, de tipo cuboide, encargadas de producir las hormonas tiroideas, tiroxina (T4) y la triiodotironina (T3); y menos de un 10% de células parafoliculares, o "células C", que secretan calcitonina, relacionada con la homeostasis del calcio-fósforo (De la Cruz Palomino, 1995). Las células foliculares tienen la particularidad de estar polarizadas para secretar sus

productos hacia la cavidad folicular. Esta cavidad está llena de coloide, que contiene moléculas de tiroglobulina, y aminoácidos yodados unidos a ellas por enlaces peptídicos. Las células foliculares están en contacto con los lechos capilares por donde serán secretadas las hormonas tiroideas.

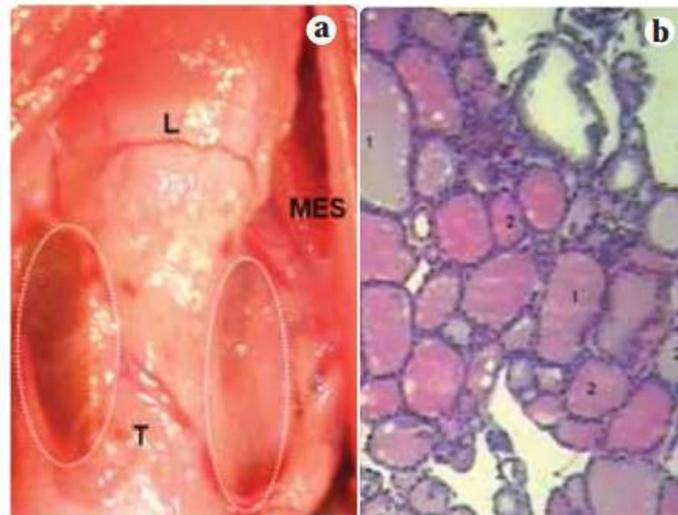


Figura 2. Localización anatómica de la tiroides (a) e histología (b). a - L: laringe, T: tráquea, MES: músculo esternocleidomastoideo. Los lóbulos están marcados con las líneas punteadas. b - 1: folículos en reposo (mayores) y 2: folículos activos (de menor dimensión). Fuente: Castillo, V. (2011): Hipotiroidismo canino. Rev. Vet. Focus 21(1), 2-8. Figura1.

4.1.3. Síntesis y secreción de hormonas tiroideas

El yodo ingerido tiene como única función la síntesis de hormonas tiroideas. Este se absorbe a nivel intestinal como yoduro (I-) y se transporta de forma activa desde la circulación a la glándula tiroides. La tiroglobulina es producida por las células foliculares, siendo almacenada de forma extracelular en el interior del folículo. El I- oxidado en la superficie luminal del tirocito (mediante la tiroperoxidasa) se liga a la tiroglobulina para formar la monoiodotirosina (MIT) y la di-iodotirosina (DIT). Este proceso de organificación ocurre rápidamente uniéndose dos moléculas de DIT para formar la T4, o un MIT y un DIT, para formar T3 (Braz Da Cruz y Manoel, 2014). Bajo el estímulo de la TSH, la tiroglobulina es captada (endocitosis) por la membrana apical de la célula en dirección a la sangre. La glándula tiroides sintetiza fundamentalmente

T4, y en menor proporción T3 (ya que esta última es tres a cinco veces más potente que la T4 a nivel celular) (Braz Da Cruz y Manoel, 2014). La transformación de T4 en T3 es regulada por la deiodinasa intracelular de los diferentes tejidos (Feldman y Nelson, 2007). La variación en la concentración de esta enzima podría determinar que algunos tejidos sean más sensibles que otros a presentar hipotiroidismo a pesar de mantener niveles adecuados de hormonas tiroideas en sangre (Duncan y col., 2003). Se considera que las células tirotrópicas hipofisarias son las primeras células en volverse hipotiroideas; su capacidad para detectar la disminución precoz de los niveles de T4 diarios aumenta la secreción de TSH (Castillo, 2011). Gran parte de las hormonas tiroideas circulan en sangre ligadas a proteínas transportadoras. La globulina ligante de tiroxina (TBG) es la proteína transportadora más importante en los caninos, debido a su alta afinidad por la T4; aunque también pueden unirse a la albúmina y prealbumina (TBPA). Las hormonas ligadas actúan como reserva, disociándose a medida que la fracción libre en sangre va siendo utilizada por los tejidos (Feldman y Nelson, 2007).

4.1.4. Regulación de la función tiroidea (eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo)

La síntesis y secreción de hormonas tiroideas están reguladas por mecanismos extra e intratiroideos (TSH y autorregulación respectivamente). La TSH es el principal regulador de la actividad tiroidea, uniéndose a los receptores de la glándula para activar la liberación de T3 y T4 a la circulación. Las hormonas tiroideas, a su vez, regulan la secreción de TSH mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. La regulación del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo (H.H.T) depende de la síntesis y secreción diaria de hormonas tiroideas, ya que estas inhiben la síntesis de TRH y TSH. La hipófisis es el termostato que regula la actividad de la tiroides con un mecanismo muy simple y preciso: cuando los niveles séricos de T4 descienden, la hipófisis lo detecta y aumenta la producción de TSH que estimula la producción y liberación de más hormona tiroidea (Feldman y Nelson, 2007; Martín-Almendra, 2016). A la inversa, si los niveles de T4 se encuentran altos, aumenta la conversión de T4 a T3, con la consiguiente inhibición de la TRH y la TSH, entonces la tiroides ralentiza su actividad (Duncan y col., 2003). Las condiciones fisiológicas que alteran los niveles de TSH, y por lo tanto de T3 y T4, están relacionadas con las acciones de las hormonas tiroideas sobre la utilización de la energía y la termogénesis. Una dieta alta en calorías tiende a incrementar la disponibilidad de T3, de forma inversa el ayuno disminuye los

niveles de TRH y por lo tanto la capacidad de respuesta de la TSH y los niveles de T3. Por otra parte la exposición al frío aumenta la secreción de TSH y de hormonas tiroideas con el fin de aumentar los procesos termogénicos (De la Cruz Palomino, 1995).

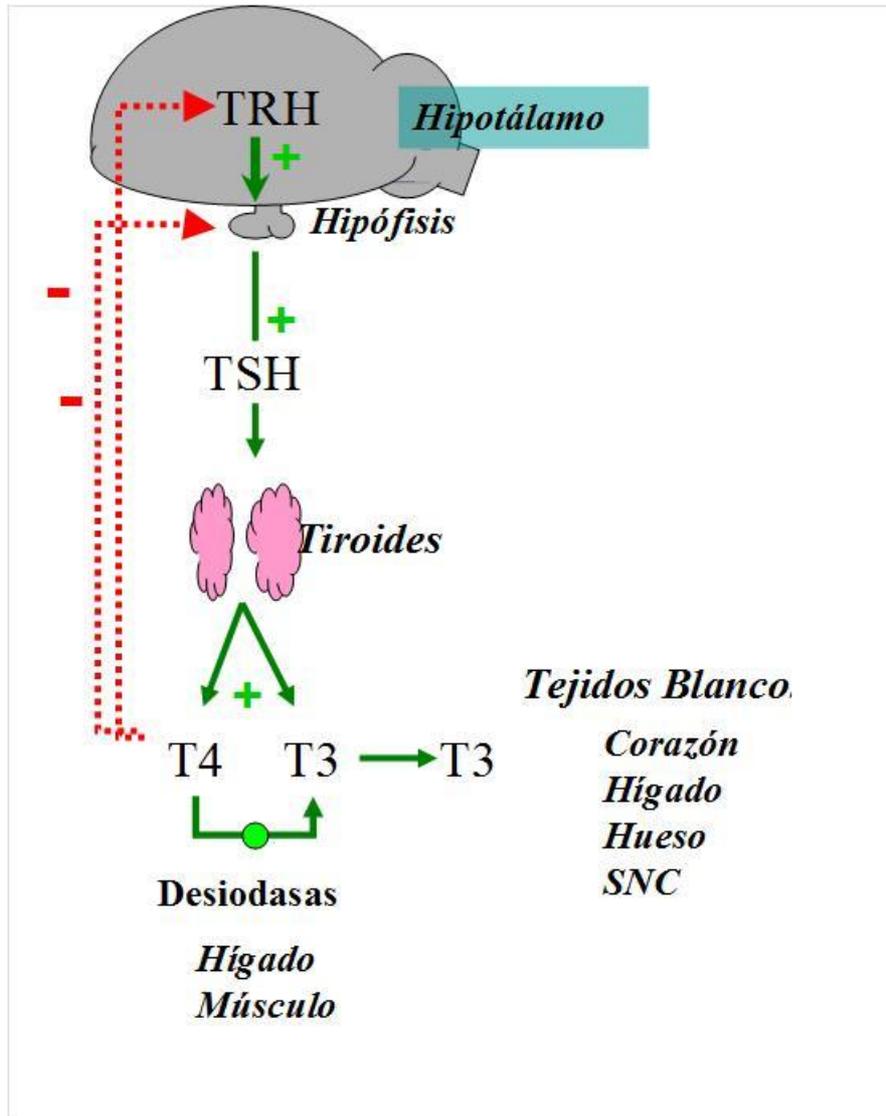


Figura 3. Regulación de la función tiroidea (eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo)

4.II. Hipotiroidismo en caninos

4.II.1. Definición y características generales del hipotiroidismo

El hipotiroidismo se define como la acción deficiente de la hormona tiroidea sobre sus órganos diana, que puede ser secundaria a la secreción insuficiente de T4 y T3, a defectos en los receptores nucleares (resistencia a la hormona) o a defectos moleculares o secretores de la TSH (Morreale y col., 2002). Esta deficiencia puede surgir por la disfunción de cualquier parte del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005).

4.II.2. Epidemiología

La prevalencia de hipotiroidismo canino es de 0.2% a 0.8% (Panciera, 1994; Dixon y col., 1999); y el hipotiroidismo adquirido representa el 97% de los casos, mientras que el congénito contribuye solo con un 10% de la casuística (Feldman y Nelson, 2007). Esta endocrinopatía se da generalmente en perros mayores a un año (Dixon y col., 1999; Castillo, 2011); siendo la edad promedio en el momento del diagnóstico de 7 años (Dixon y col., 1999; Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005; Castillo, 2011). Las razas caninas reportadas como de mayor riesgo de hipotiroidismo son el Golden Retriever, el Doberman Pinscher, el Labrador retriever, el Caniche, el Cocker el Bóxer y el Beagle (Milne y Hayes., 1981; Panciera, 1994; Dixon y col., 1999). Si bien no existe un consenso internacional sobre el riesgo de hipotiroidismo canino acorde al género, algunos estudios sugieren cierta predisposición en las hembras. Pedersen y col. (1999) reportaron un mayor riesgo en las hembras intactas, mientras que un estudio previo basado en 90.090 registros de pacientes informó que las hembras castradas tenían un 1.5 a 2 veces mayor riesgo de padecer tiroiditis linfocítica

autoinmune que los machos castrados (Sundburg y col., 2016). En contraposición otros estudios no encontraron diferencias y ambos sexos estarían igualmente representados (Dixon y col., 1999; Mooney, 2011), siendo sí la castración un factor de riesgo significativo (Milne y Hayes 1981; Panciera, 1994).

4.II.3. Origen y causas del hipotiroidismo

El hipotiroidismo puede ser primario, si la patología que lo origina se encuentra en la glándula tiroides, o central si se origina en la hipófisis (secundario), o en el hipotálamo (terciario) (Mooney, 2017). Asimismo el hipotiroidismo puede ser congénito o adquirido, dependiendo de la edad en que la enfermedad se establezca (Mooney y Shield, 2012).

Hipotiroidismo adquirido primario

En caninos el hipotiroidismo adquirido primario, representa más del 95% de los casos clínicos (Dixon, 2004; Graham y col., 2007). Aproximadamente la mitad de ellos son consecuencia de una tiroiditis linfocítica (inmunomediada) y el 50% de los casos restantes son causados por una atrofia idiopática de la glándula tiroidea (Dixon, 2004; Feldman y Nelson, 2007; Graham y col., 2007).

La tiroiditis linfocítica se caracteriza por la destrucción autoinmune de la tiroides; el propio organismo produce anticuerpos contra la tiroglobulina, tiroperoxidasa y las hormonas T3 y T4 (Braz Da Cruz y Manoel, 2014). La infiltración de la glándula por parte de plasmocitos, linfocitos y macrófagos, junto con la formación de nódulos linfoides produce una destrucción irreversible de los folículos y consecuente fibrosis (Mooney y Shield, 2012). La atrofia idiopática de la tiroides se describe como un proceso degenerativo con una sustitución gradual del tejido glandular por tejido adiposo y conjuntivo, y una reacción inflamatoria mínima (Feldman y Nelson, 2007). La causa de este proceso todavía se desconoce, pero algunos autores creen que puede corresponder al estadio final de la tiroiditis linfocítica, dado que algunos animales con tiroiditis linfocítica se tornan negativos a los TgAAs en ese estadio (Mooney, 2017).

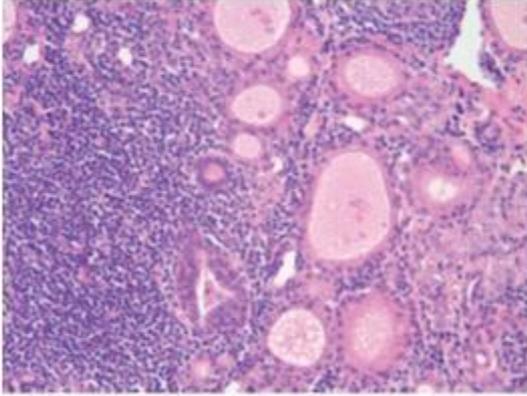
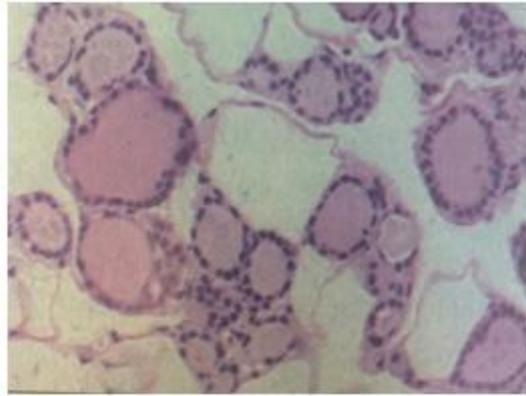
A**B**

Figura 4. A: Tiroiditis linfocítica. Acúmulo de linfocitos en la glándula tiroides con pérdida de folículos. Los folículos restantes contienen coloides pálidos con vacuolas y restos celulares. Tinción de hematoxilina-eosina. B: Atrofia idiopática tiroidea. Tejido adiposo sustituyendo el parénquima tiroideo normal. Fuentes: Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005 (Figura 287-3); Dixon, 2004 (Figura 10.3).

Hipotiroidismo adquirido central

El hipotiroidismo adquirido central se ha registrado en perros aunque es muy raro (menos del 5% de la casuística). La glándula tiroides no está primariamente afectada sino privada de la correcta estimulación por parte de la TSH (hipotiroidismo secundario) o la TRH (hipotiroidismo terciario) (Mooney, 2017). Las causas más comunes de hipotiroidismo secundario incluyen neoplasias hipofisarias, hipofisectomías y, menos frecuentemente, deficiencias postraumáticas (Foley y col., 2009; Mooney, 2017). El hipotiroidismo terciario sólo se describió en un perro con neoplasia hipotalámica (Shiel y col., 2007).

Hipotiroidismo congénito

El hipotiroidismo congénito es muy poco frecuente y puede deberse a defectos en el desarrollo de la glándula tiroides, a la deficiencia de peroxidasa en determinadas razas

(Toy Fox Terriers y Rat Terriers) (Fyffe y col., 2003; Pettigrew y col., 2007), o a un defecto en la secreción de TSH (por ejemplo por insuficiencia adenohipofisaria) (Castillo, 2011). Este debe diferenciarse del hipotiroidismo juvenil, ya que este último se produce como consecuencia de la hipotiroxinemia materna (que afecta a todos los fetos (Feldman y Nelson, 2007).

4.II.4. Signos clínicos del Hipotiroidismo

Signos clínicos del Hipotiroidismo adquirido

Las hormonas tiroideas son necesarias para las funciones metabólicas celulares normales del cuerpo, por lo tanto su deficiencia afecta a casi todos los sistemas orgánicos. Como resultado los signos clínicos no son específicos y dependen en parte de la edad del animal en el momento en que se establece la deficiencia hormonal (Feldman y Nelson, 2007).

Los signos asociados a la disminución de la tasa metabólica incluyen letargo, embotamiento mental, aumento de peso, falta de voluntad para hacer ejercicio, e intolerancia al frío (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005). Con frecuencia se observa un exceso de peso corporal y obesidad (30%), pero muchos perros pueden presentar un peso normal o incluso pérdida de peso (Castillo, 2011).

La presentación clínica dermatológica ocurre en un 60% a 80% de los caninos hipotiroideos, apareciendo en los estadios más tardíos de la enfermedad (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005). La caída generalizada del pelo ocurre solo en un 20% de los casos (Castillo, 2011); siendo generalmente bilateral, simétrica y evidente en áreas de desgaste (tronco lateral, tórax ventral y cola) (Feldman y Nelson, 2007). Los hallazgos dermatológicos más comunes incluyen piel escamosa seca, cambios en calidad o color del pelo, alopecia, seborrea (seca u oleosa), y pioderma superficial. Además puede ocurrir hiperqueratosis, hiperpigmentación, formación de comedones, hipertrichosis, otitis, y mixedema (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005; Feldman y Nelson, 2007). Los signos de disminución de la tasa metabólica en conjunto con anomalías dermatológicas debe aumentar la sospecha de hipotiroidismo (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005).

Otros hallazgos asociados al descenso en los niveles de hormonas tiroideas suelen ser el anestro persistente, celos silentes y abortos espontáneos en perras, mientras que los machos pueden cursar con oligo/azoospermia, atrofia testicular y ausencia de libido. En muy raras ocasiones puede observarse galactorrea (en ambos sexos) (Castillo, 2011). Dado el impacto de las hormonas tiroideas en la función del sistema nervioso, el descenso de sus niveles puede inducir axonopatías y desmielinización segmentaria, resultando en alteraciones neurológicas tanto centrales como periféricas (Feldman y Nelson, 2007). Otros signos clínicos reportados en perros hipotiroideos comprenden trastornos oculares como la lipidosis corneal y la queratoconjuntivitis seca; alteraciones del comportamiento (especialmente agresión), agravamiento de trastornos cardíacos preexistentes y sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005; Feldman y Nelson, 2007). El coma mixedematoso es una complicación rara del hipotiroidismo avanzado que cursa con estupor, hipotermia, bradicardia, y edema de piel. Su pronóstico es reservado ya que puede llegar a cursar con supresión cardiovascular y respiratoria (Dixon, 2004; Feldman y Nelson, 2007).

Signos clínicos del Hipotiroidismo congénito (cretinismo)

El hipotiroidismo congénito cursa con enanismo desproporcionado, ayudando a diferenciarlo del enanismo pituitario (por deficiencia de hormona de crecimiento). Los cachorros afectados presentan retraso de la maduración y disgenesia epifisaria, característica de la condición (Feldman y Nelson, 2007). El hipotiroidismo congénito también produce retraso mental, macroglosia, hipotermia, erupción dental tardía, ataxia y distensión abdominal (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005).

4.II.5. Diagnóstico del hipotiroidismo

Ante la sospecha de un paciente canino con hipotiroidismo primario es importante tener en cuenta que los signos clínicos de esta endocrinopatía no son específicos (Feldman y Nelson, 2007; Braz da Cruz y Manoel, 2014); que ninguno de los test endócrinos disponibles es 100% preciso; y que alguno de los fármacos utilizados así

como enfermedades no tiroideas pueden afectar los resultados de las pruebas endócrinas (Dixon, 2004). El diagnóstico definitivo de hipotiroidismo implicaría que se realice una valoración de hormonas específicas: T4T, T4L y TSH (Ferguson, 1994; Kemppainen y Behrend, 2001; Hoh y Oh, 2006), junto con un diagnóstico clínico y la exclusión de enfermedades no tiroideas a través de una bioquímica sanguínea completa (Dixon, 2004; Nelson y Couto, 2014).

Diagnóstico de aproximación

Comprende todas aquellas pruebas de rutina que permiten la orientación diagnóstica, y que detectan cambios inespecíficos que se presentan en gran parte de los perros hipotiroideos.

Hematología

La alteración más característica en el hemograma es una anemia leve, normocrómica, normocítica, no regenerativa (Marca y col., 1996; Dixon, 2004). No obstante, éste es un hallazgo inespecífico que se presenta en sólo el 30% de los casos de hipotiroidismo canino (Panciera, 1999; Panciera, 2001). En algunos casos de hipotiroidismo canino se han descrito trastornos en la coagulación (Sullivan y col, 1993). Actualmente está claro que las coagulopatías no son una característica del hipotiroidismo por sí mismas, aunque ciertas razas como el Doberman Pinscher sufren frecuentemente ambas condiciones (Dixon, 2004).

Perfil Bioquímico

Enzimas hepáticas y fructosamina

La medida de las enzimas hepáticas y de la fructosamina séricas están incluidas en el perfil bioquímico completo. Sin embargo la utilidad de estos test en el diagnóstico de hipotiroidismo es limitada, ya que se encuentran aumentos similares en muchas otras

enfermedades de origen no tiroideo. El hipotiroidismo canino produce un aumento leve de las enzimas hepáticas, especialmente de la fosfatasa alcalina sérica (FAS) y gamma-glutamil transferasa (GGT) en el 30% de los casos (Panciera, 1994; Dixon, 2004). En perros hipotiroideos los valores de fructosamina pueden ser altos pero dentro del rango de referencia, próximos al límite superior (300µmol/L) (Reusch y col., 2002). Estos valores aumentados pueden ocurrir debido a una reducción del turn-over proteico, o cualquier cambio del control glucémico (Dixon, 2004), por lo tanto estas mediciones pueden ser de utilidad en pacientes no diabéticos (Dixon y col., 1999).

Lipidograma completo (triglicéridos, colesterol, HDL y LDL)

El hipotiroidismo produce tanto un descenso en el índice de degradación de lípidos como una reducción de su síntesis. Sin embargo, lo primero está afectado de manera más extensa y el efecto es una acumulación de lípidos en la circulación (hiperlipidemia) (Dixon, 2004). La principal alteración lipídica en el hipotiroidismo canino es la hipercolesterolemia, que se da en más del 80% de los casos (Dixon, 2004; Feldman y Nelson, 2007). También es posible, en menor frecuencia, el desarrollo de hipertrigliceridemia y modificaciones lipoproteicas (Mooney, 2017). La hipercolesterolemia se debe a un descenso en el metabolismo del colesterol, que produce una reducción en su utilización y consecuente aumento de la producción hepática (Braz da Cruz y Manoel, 2014). Además ocurre una reducción tanto en la excreción del colesterol como en su conversión en ácidos biliares (Panciera, 1999). Las hiperlipidemias aunque muy frecuentes en los caninos hipotiroideos, no son patognomónicas ya que los valores lipídicos varían en función de la dieta que recibe el animal y también aumentan en otras patologías como la diabetes mellitus, obesidad, síndrome nefrótico, pancreatitis aguda, ictericia obstructiva, hiperadrenocorticismismo y ciertas retinopatías (Marca y col., 1996). Sin embargo, la magnitud del aumento del colesterol en el hipotiroidismo es mucho mayor que en estas enfermedades (Mooney y Shield, 2012); encontrándose concentraciones mayores a 773 mg/dL en caninos hipotiroideos (Dixon, 2004).

En relación a las lipoproteínas, el perro es una especie HDL dependiente (70% del colesterol es HDL) y la relación óptima HDL-LDL es 3-1. Cuando esta relación se pierde (2-1 o menor), denota un aumento de la fracción LDL (Castillo y col., 2017), que

podría explicarse por el efecto regulador que tienen las hormonas tiroideas sobre el receptor de LDL, estimulando su excreción hepática (Chait y col., 1979). Si los niveles de triglicéridos se encuentran dentro de los rangos normales, pero la fracción LDL del colesterol está aumentada, podemos suponer un problema de depuración del LDL a nivel hepático, posiblemente como consecuencia de la insuficiencia de hormonas tiroideas (Barrie y col., 1993; Castillo y col., 2017).

Es importante considerar que los niveles de colesterol y triglicéridos circulantes pueden variar no solo como consecuencia secundaria a una enfermedad sistémica, sino por factores fisiológicos como la edad, la raza, el género, el estilo de vida o el tipo de dieta. Se ha reportado que los caninos presentan concentraciones más altas de colesterol y triglicéridos en la primera semana del período neonatal en comparación con la etapa pos destete (hasta los 84 días de vida) (Wright-Rodgers y col., 2005). En este mismo sentido, cachorros menores a un año presentaron niveles superiores al compararlos con perros adultos (Pasquini y col., 2008). Sin embargo no se han observado diferencias para estos metabolitos entre perros adultos (4-10 años) (Downs y col., 1993). Se han reportado razas de mayor riesgo a presentar hiperlipidemia como el Beagle y el Spaniel bretón (Wada y col., 1977; Hubert y col., 1987). Pasquini y col. (2008) observaron en las razas Rottweiler y Mastín de los Pirineos mayor concentración de colesterol en relación a otras razas, mientras que otros estudios no observaron diferencias en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos (Downs y col., 1993). Con respecto al género, la información disponible es contradictoria, algunos estudios reportan mayores concentraciones en hembras (Kaspar y Norris, 1977; Pasquini y col., 2008; Pessina y col., 2009; 2010; 2014); mientras que otros no encuentran diferencias entre géneros (Downs y col., 1993; Coppo y col., 2003; Osorio, 2006; Osorio, 2008). Por otro lado, la dieta ha demostrado tener una gran influencia en el metabolismo lipídico ya que perros alimentados con diferentes alimentos presentan diferencias en los valores plasmáticos de colesterol y triglicéridos (Wright-Rodgers y col., 2005; Pasquini y col., 2008).

Test endócrinos

La evaluación de la función de la glándula tiroidea se realiza mediante la medición de la concentración de las hormonas tiroideas y TSH en el suero o por pruebas dinámicas de función tiroidea, en las cuales se evalúa la respuesta de la glándula a la estimulación con TSH o TRH (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005). Estas últimas no son utilizadas de rutina en la práctica clínica debido a su poca disponibilidad y al desarrollo de test de cuarta generación (quimioluminiscencia) (Mooney y Shield, 2012). Por otro lado el diagnóstico de tiroiditis linfocítica se realiza midiendo los autoanticuerpos circulantes contra diferentes antígenos de la tiroidea como la Tg, T4, T3 y la TPO (Mooney, 2017).

Dependiendo de los niveles de hormonas tiroideas y TSH la endocrinopatía se clasifica en dos grandes estadios: Hipotiroidismo subclínico y clínico. El hipotiroidismo subclínico es la primera fase de la enfermedad (el término "subclínico" no hace referencia a la ausencia de signos clínicos sino a que la manifestación de los mismos es de leve a moderada) y representa aproximadamente el 25% de todos los casos. Se caracteriza por un aumento en la concentración de TSH sin alteración en los niveles de T4T y T4L (Castillo, 2011). La etapa de hipotiroidismo clínico en cambio, cursa con concentraciones séricas de las hormonas tiroideas por debajo del límite inferior de su intervalo de referencia. Debido a esto, en el hipotiroidismo primario ocurre una pérdida de la retroalimentación normal que regula la síntesis y secreción de TSH por la hipófisis. Por lo tanto, se espera que la mayoría de los animales hipotiroideos presenten concentraciones de TSH por encima de los intervalos de referencia (Mooney y Shield, 2012).

Test de estimulación con TSH

Esta prueba tiene como objetivo evaluar la actividad de la tiroidea, mediante el estímulo con TSH exógeno. La administración de una dosis grande de TSH causa la secreción de hormonas tiroideas, particularmente de T4T (Feldman y Nelson, 2007). A pesar de ser considerado un test estándar en el diagnóstico de hipotiroidismo canino diversos factores hacen que su uso sea poco viable en la práctica clínica, como el alto costo de la TSH y las posibles reacciones indeseables que puede sufrir el animal durante el procedimiento (Braz Da Cruz y Manoel, 2014).

Test de estimulación con TRH

El test de estimulación con TRH permite diferenciar entre hipotiroidismo primario, en donde la respuesta al estímulo es la producción excesiva de TSH e hipotiroidismo secundario, en donde no hay una respuesta al estímulo (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005). Si bien es posible que un canino sea hipotiroideo si la concentración de T4T posterior a la TRH se encuentra por debajo de $<1.5 \mu\text{g} / \text{dL}$; algunos perros eutiroideos no responden al estímulo con TRH (Panciera y col., 2000). Por lo tanto esta prueba es menos confiable que la prueba de respuesta de TSH para el diagnóstico de hipotiroidismo canino (Braz Da Cruz y Manoel, 2014).

Determinación de Anticuerpos anti tiroglobulina (TgAA)

Los autoanticuerpos que se forman contra la tiroglobulina (TgAAs) son los más prevalentes en el perro, presentándose en el 36% de los caninos con tiroiditis linfocítica (Dixon y col., 1999, Graham y col., 2007). Existen varias pruebas disponibles para la medición de estos TgAAs, siendo ELISA la más utilizada (Nachreiner y col., 1993, Scott-Moncrieff, 2010). La principal limitación de la medición de los TgAA para el diagnóstico de hipotiroidismo es que no todos los perros hipotiroideos tienen tiroiditis linfocítica, e incluso aquellos perros positivos a TgAA se vuelven eventualmente negativos en un momento dado (Dixon, 2004; Graham y col., 2007). Por esta razón, mientras que un resultado positivo proporciona una fuerte evidencia de tiroiditis linfocítica, un resultado negativo no lo descarta (Mooney y Shield, 2012). Además, la identificación de los TgAA no proporciona información sobre la función tiroidea, pues la tiroiditis subclínica puede estar presente durante largos períodos de tiempo antes de evolucionar a un estadio de hipotiroidismo clínico, si es que esto ocurre (Scott-Moncrieff, 2010; Mooney, 2017).

Concentración sérica de T4T

La concentración sérica de T4T basal es la suma de la hormona ligada a proteínas y libre circulante en sangre (Feldman y Nelson, 2007). La medida de T4T se utiliza rutinariamente como test de primera línea en el diagnóstico de hipotiroidismo, ya que presenta una sensibilidad del 90% en el caso de estar asociada a signos clínicos

compatibles con esta endocrinopatía (Peterson y col., 1997). En general, los valores de T4T dentro del intervalo de referencia excluyen la enfermedad, a menos que el animal sea hipotiroideo y tenga autoanticuerpos anti hormonas tiroideas en circulación, que interfieren con las mediciones de T4T en la mayoría de los métodos comerciales disponibles (Mooney, 2017). Sin embargo su especificidad es baja (70%), ya que la disminución de la concentración de T4T puede darse como consecuencia de una enfermedad no tiroidea o terapias con determinados fármacos (Peterson y col., 1997; Scott-Moncrieff y col., 2012). Los métodos comúnmente utilizados para la medición de T4T son el radioinmunoensayo (RIA), el inmunoensayo enzimático (ELISA) y quimioluminiscencia (Braz Da Cruz y Manoel, 2014). Si bien el rango de referencia para esta hormona varía de acuerdo a la bibliografía que se consulte, el intervalo de 1.5 y 3.5 µg/dL fue reportado como el más utilizado por los laboratorios clínicos veterinarios (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005).

Concentración sérica de T4L

La T4L corresponde al 0.1% de T4 que no está ligada a las proteínas plasmáticas (Dixon y col., 1999), siendo la fracción que ingresa a las células (biológicamente activa). El eje H.H.T prioriza la manutención de los niveles séricos de T4L y estos se ven menos afectados por las fluctuaciones en las proteínas de transporte al no estar unidas a las mismas. Por lo mencionado anteriormente, la determinación de T4L refleja con mayor precisión la funcionalidad tiroidea (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005; Braz Da Cruz y Manoel, 2015). La T4L puede determinarse por diferentes metodologías como el radioinmunoensayo (RIA), la quimioluminiscencia (QL) o por diálisis de equilibrio (DE). El procedimiento más preciso para medir esta hormona es la DE ya que los autoanticuerpos y la concentración de proteínas circulantes no interfieren con esta técnica. Sin embargo debido a su alto costo y la demora en la ejecución no es la metodología más utilizada por los laboratorios convencionales (Peterson y col., 1997; Dixon y col., 1999). Algunos autores consideran que los niveles de T4L medidos por métodos análogos son más bajos que aquellos obtenidos por DE y no presentan ventajas diagnósticas sobre la medición de la T4T (Dixon, 2004; Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005). Otros en cambio han validado la determinación de T4L por quimioluminiscencia en caninos y la consideran una herramienta valiosa en el diagnóstico (Paradis y col., 1996; Piechotta y col., 2010).

Concentración sérica de T3

La determinación de la concentración sérica de T3 no es relevante en el diagnóstico de hipotiroidismo canino, ya que sus niveles en animales hipotiroideos y eutiroideos son muy próximos (Feldman y Nelson, 2007). La mayor parte de la T3 circulante proviene de la desiodinación de la T4 en los tejidos extra tiroideos, proceso que resulta estimulado por las altas concentraciones de TSH en un animal hipotiroideo. Por lo tanto la mayor producción periférica de T3 en detrimento de la T4 hace que el 90% de los caninos hipotiroideos presenten niveles normales de T3 (Panciera, 2001).

Concentración sérica de TSH

La medición aislada de TSH no es recomendada en la confirmación del hipotiroidismo, ya que su especificidad y sensibilidad no superan el 80% y el 75%, respectivamente (Peterson y col., 1997; Mooney y Shield, 2012). A pesar de que la mayoría de los perros hipotiroideos presentan concentraciones de TSH por encima de los intervalos de referencia, alrededor del 30% de los animales con hipotiroidismo exhiben valores de TSH debajo o dentro de este intervalo (Panciera, 1999; Kooistra y col., 2000; Scott-Moncrieff y col., 2012). Las posibles razones propuestas hasta el momento son las fluctuaciones aleatorias de sus niveles séricos, la supresión debida a fármacos o enfermedades concurrentes, las dificultades en detectar isoformas de TSH circulante y el descenso en la producción de TSH en el hipotiroideo crónico (Feldman y Nelson, 2007; Braz Da Cruz y Manoel, 2014). Cuando la TSH se mide junto con la T4T o T4L, aumenta su precisión diagnóstica a un 90% (Feldman y Nelson, 2007). Si bien las dos técnicas más utilizadas en los laboratorios clínicos para la medición de TSH canina son el inmunoensayo quimioluminiscente y el RIA, al compararlos, el primero demostró tener una mayor precisión (Marca y col., 2001).

El diagnóstico endócrino de rutina del hipotiroidismo canino implica la valoración de los test endócrinos de primera línea: T4T, T4L y TSH (Ferguson, 1994; Kemppainen y Behrend, 2001; Hoh y Oh, 2006). La validez de una prueba diagnóstica depende de su capacidad para detectar correctamente la presencia o ausencia de la enfermedad que se estudia. Si bien no existe una prueba de laboratorio perfecta, cada una tiene sus ventajas y desventajas en base a su sensibilidad y especificidad diagnósticas. Estos

índices se obtienen a partir del análisis de una serie de pacientes a los que se les realiza una prueba diagnóstica (prueba en estudio), comparándose sus resultados con los de una prueba de superior rendimiento diagnóstico (prueba de referencia, estándar o patrón oro) (de Adana Pérez, 2009)

La determinación de la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica puede variar de acuerdo a la técnica de medición utilizada y a los intervalos de referencia empleados en el diagnóstico de la enfermedad (Braz Da Cruz y Manoel, 2014).

De todas las mediciones de hormonas individuales evaluadas (T4T, T4L, TSH), la medición de la concentración de T4T es la de mayor sensibilidad diagnóstica como prueba para el hipotiroidismo. La T4L tiene una sensibilidad más baja, pero especificidad y precisión más altas que la T4T (Scott-Moncrieff y col., 2012). En comparación con la T4L, la medición de la concentración de TSH tiene una sensibilidad y una precisión más bajas, pero similar especificidad. Cuando las concentraciones de T4 (total o libre) y de TSH se evalúan juntas, la especificidad es mayor que cuando la concentración de T4 o TSH se evalúan por separado (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de pruebas de diagnóstico tiroideo en el perro (%). Fuente: Scott-Moncrieff y col., 2012.

Test	Sensibilidad %	Especificidad %	Precisión %
T4T	89	82	85
T4L	80	93	95
TSH	76	93	84
TSH/T4T	63	98	88
TSH/T4L	74	98	86

T4T: tiroxina total; T4L: tiroxina libre; TSH: hormona estimulante de la tiroides. Los datos pertenecen a Peterson y col., 1997 (n=54 perros hipotiroideos) y Dixon y col., 1999 (n=30 perros hipotiroideos).

Efecto de las enfermedades de origen no tiroideo (ENT) en la concentración de las H.T

Los perros con enfermedades no-tiroideas (ENT) con frecuencia presentan bajos niveles séricos de T4T como parte de la respuesta fisiológica a las mismas (Síndrome

del Eutiroideo Enfermo) (Pancieria y col., 2003; Nelson y Couto, 2014). La magnitud de esta disminución depende de la gravedad de la ENT y ha sido reportada como un predictor de mortalidad (Elliott y col., 1995). Si bien se ha demostrado que la presencia de ENT implica una variación en la concentración no sólo de la T4T sino también de la T4L y TSH (sugestivas de hipotiroidismo), el efecto de las ENT sobre los valores de estas dos últimas es menos común y menos dramático (Kantrowitz y col., 1999; Braz Da Cruz y Manoel, 2014). Entre las ENT que disminuyen los niveles de las hormonas mencionadas se incluyen el hiperadrenocorticismo, la cetoacidosis diabética, el hipoadrenocorticismo, la insuficiencia renal, enfermedad hepática, neuropatía periférica, megaesófago generalizado, insuficiencia cardíaca y neoplasias (Ferguson, 1998; Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran., 2005; Scott-Moncrieff y col, 2012).

Efecto de los fármacos en la concentración de las H.T

Además de las ENT, la acción de ciertos fármacos puede influir en la glándula tiroides y afectar los resultados de los test de perfil tiroideo, complicando su interpretación (Feldman y Nelson, 2007; Scott-Moncrieff y col., 2012). Los glucocorticoides tienen un efecto sobre la concentración sérica de hormonas tiroideas similar al observado en caninos con el hiperadrenocorticismo espontaneo (la concentración de T4T y T4L disminuye, mientras la TSH suele mantenerse en el rango de referencia) (Feldman y Nelson, 2007). Este efecto depende de la dosis y la presentación, siendo que las concentraciones de hormonas tiroideas vuelven a la normalidad una semana después de suspender el tratamiento si la dosificación es de 3 semanas o menos. Un tratamiento más largo puede prolongar la duración de la supresión (Scott-Moncrieff y col., 2012). Algunos antibióticos como los productos de sulfonamida, al bloquear la yodación de la tiroglobulina, pueden llegar a ocasionar un hipotiroidismo reversible durante su uso en perros (Gookin y col., 1999; Kantrowitz y col., 1999 Daminet y Ferguson, 2003). Siendo necesario un tiempo de espera de 3 semanas luego de su interrupción para realizar las pruebas diagnósticas tiroideas (Scott-Moncrieff y col., 2012). Por último el fenobarbital causa concentraciones disminuidas de T4T y T4L y leves aumentos en los niveles de TSH sin evidencia clínica de hipotiroidismo (Gaskill y col., 1999; Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005).

Debemos considerar que las concentraciones de hormonas tiroideas pueden variar no sólo por la presencia de las variables mencionadas, sino por factores fisiológicos. Se ha demostrado que factores como la edad, el género, la talla, y la raza pueden hacer variar las concentraciones séricas de T4T, T4L y TSH (Reimers y col., 1990; Gaughan y Bruyette, 2001). Sin embargo, estas variaciones no son consideradas a la hora de establecer los valores de corte para diagnosticar el hipotiroidismo a nivel internacional; es decir, el rango de referencia no se establece teniendo en cuenta estos factores, por lo que la precisión del diagnóstico puede ser menor, sobre todo en etapas tempranas de la enfermedad (hipotiroidismo subclínico). Debe considerarse también que cada laboratorio tiene o debe tener sus propios valores de referencia para las hormonas tiroideas para una población dada, ya que los valores de corte para dichas hormonas pueden además diferir considerablemente entre regiones o países (Hubl y col., 2002).

Edad

La edad es uno de los factores fisiológicos que se asocian a variaciones en las concentraciones séricas de hormonas tiroideas y TSH. En perros, varios estudios describen que a medida que la edad aumenta, las concentraciones de T4T y T4L disminuyen (Ramírez y Osorio, 2009; Shiel y col., 2010; Scott-Moncrieff y col., 2012; Hegstad –Davies y col., 2015), y los niveles de TSH aumentan (Bhatti y col. 2006; Fialkovicová y col., 2012; Hegstad –Davies y col., 2015). Se ha reportado que en caninos sanos la concentración de T4T y T4L descienden a razón de 0,004 ng/dL por mes de edad y la concentración de TSH aumenta 0,01 ng/mL por cada mes (Hegstad –Davies y col., 2015). En otro estudio a pesar de que la concentración de T4T en caninos sanos también desciende con la edad, los animales mayores de 12 años tienen la concentración media de T4T más alta (Vi oiu y col., 2013). Otros autores, si bien reconocen que existe una tendencia a que la concentración de T4T descienda a medida que la edad avanza, no encuentran diferencias significativas entre categorías etarias (Mosallanejad y col., 2014; Patkar y col., 2014); o sólo encuentran diferencias al comparar adultos con gerontes, siendo las concentraciones de T4T más bajas en esta última categoría (González y col., 1988). Las posibles causas propuestas para el descenso en los niveles de T4T y T4L con la edad son los cambios en la respuesta por parte de la glándula tiroidea a la estimulación de la TSH (Studer y col., 1978) y la atrofia, fibrosis o degeneración de la glándula tiroidea con la vejez (Scott-Moncrieff y col., 2012). Mientras que el aumento en los niveles de TSH con la edad sea asociado a

una respuesta -por retroalimentación del eje H.H.T- de disminución de los niveles séricos de hormonas tiroideas con la edad, o a algún desorden no tiroideo (Viou et al., 2013).

Género

En caninos la información acerca del efecto del género sobre los niveles de hormonas tiroideas y TSH es contradictoria. Para algunos autores el género afecta la concentración sérica de T4T y T4L, siendo mayor en hembras que en machos (Reimers y col., 1984; Shiel y col., 2010; Pessina y col., 2014; Hegstad-Davies y col., 2015). Mientras que otros estudios no encuentran diferencias entre géneros (Ramírez y Osorio, 2009; Mosallanejad y col., 2014; Patkar y col., 2014; Osorio y Suárez, 2016). Las concentraciones de hormonas tiroideas son mayores en hembras en etapa de diestro o preñadas, en relación con hembras en anestro, proestro o hembras lactantes (Feldman y Nelson, 2007). Sin embargo un estudio realizado en perros sanos revela que la concentración de T4T y T4L es mayor en hembras que en machos aún luego de retirar del análisis a las hembras en etapa de diestro (Hegstad-Davies y col., 2015). Con respecto a lo reportado para los niveles séricos de TSH, si bien los estudios son escasos, no se encuentran diferencias entre géneros (Shiel y col., 2010; Hegstad-Davies y col., 2015). En caninos aún se desconoce el mecanismo de acción de las hormonas sexuales sobre la glándula tiroidea. La testosterona produce un descenso en los niveles de proteína fijadora de tiroxina (TBG), pudiendo interferir en la concentración de T4T (Feldman y Nelson, 2007).

Talla-Raza

La concentración media de T4T es mayor en razas de talla pequeña en comparación con razas medianas y grandes (Reimers y col., 1990). Además existen razas como la Greyhound que tiene una concentración de T4T y T4L significativamente más baja que las demás razas (Gaughan y Bruyette, 2001; Shiel y col., 2007), así como las razas Basenjis, perros de trineo de Alaska, Sloughis, Whippet y Scottish Deerhounds que poseen valores de T4T o T4L ubicados por debajo o en el límite inferior del rango de referencia para estas hormonas (Lee y col., 2004; Van Geffen y col., 2006; Panakova y col., 2008; Seavers y col., 2008; Sheerer y col., 2013). Por otro lado el Samoyedo, Siberian Husky y Keeshond si bien presentan valores de T4T y T4L dentro del

intervalo de referencia para la población canina general, presentan valores más altos para estas hormonas que otras razas caninas (Hegstad-Davies y col., 2015). Los niveles séricos de TSH no varían con la raza (Gaughan y Bruyette, 2001; Van Geffen y col., 2006; Shiel y col., 2007; Seavers y col., 2008; Panakova y col., 2008). En cambio otro estudio reporta una mayor concentración de TSH en la raza Collie, Samoyedo y Keeshond en comparación con los rangos de referencia generales caninos (Hegstad-Davies y col., 2015).

Diagnóstico por imagen

Las técnicas utilizadas comprenden la ultrasonografía y técnicas de imagen más avanzadas como la resonancia magnética, la tomografía computarizada y la centellografía; a pesar de que la utilidad de estas tres últimas continúa siendo bastante reducida en la práctica clínica (Taeymans y col., 2007).

Radiografía de la tiroides

La radiografía convencional no es útil para la evaluación de hipotiroidismo adquirido, sin embargo, en casos de hipotiroidismo congénito permite evaluar anomalías del retraso en la osificación y disgenesia epifisarias propias de esta patología (Taeymans y col., 2007; Castillo, 2017).

Ultrasonografía de la tiroides

La ultrasonografía permite evaluar el tamaño, la forma y la ecogenicidad de la tiroides en perros con diagnóstico presuntivo de hipotiroidismo (Feldman y Nelson, 2007; Castillo, 2017). El volumen relativo de la tiroides es el parámetro con mayor especificidad en la diferenciación entre animales hipotiroideos y eutiroideos (Reese y col., 2005)

Otras técnicas como la centellografía, tomografía computada y resonancia magnética pueden ser utilizadas en el diagnóstico de hipotiroidismo si bien esto es poco probable

debido a su alto costo o a la necesidad de anestesia general para su realización (Mooney y Shield, 2012; Mooney, 2017).

4.II.6. Tratamiento del hipotiroidismo

Los caninos con diagnóstico de hipotiroidismo necesitan tratamiento de reemplazo de hormona tiroidea por el resto de sus vidas. El tratamiento independientemente de la causa del hipotiroidismo, es la levotiroxina de sodio sintética. Este fármaco tiene un tiempo de vida media circulante de 10 a 14 horas en caninos, pero dado que su semivida intracelular es de 24 horas, -y que los tejidos desionizan la cantidad de T4 que necesitan-, el tratamiento puede realizarse con una sola dosis diaria (Dixon y col., 2002; Castillo, 2011). Se recomienda administrar el fármaco por la mañana para que la toma consecuente de muestras de control puedan cumplirse correctamente (Dixon, 2004). La dosis recomendada en el hipotiroidismo clínico es de 11-22 $\mu\text{g}/\text{kg}$, cada 24 horas (SID) para la mayoría de los animales, empezando por la dosis menor y aumentándola gradualmente hasta alcanzar la concentración deseada (siendo la dosis máxima de 800 μg) (Mooney y Shield, 2012; Mooney, 2017). En etapas iniciales de la enfermedad (hipotiroidismo subclínico) la dosis recomendada es inferior (entre 3 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Castillo, 2011). El tratamiento del hipotiroidismo debe ser sustitutivo (no supresor) y dinámico, ajustando el régimen de dosis a factores fisiológicos (edad del animal, gestación y proximidad del apareamiento) y patológicos (insuficiencia cardiaca, enfermedad renal, neoplasias o infecciones crónicas) (Castillo, 2011).

En el caso de hipotiroidismo congénito, el tratamiento debe iniciarse lo antes posible para evitar el daño irreparable del sistema nervioso central (Castillo, 2011).

4.II.7. Monitoreo del tratamiento

La toma de muestra se debe realizar 4 a 6 horas después de la administración de levotiroxina si se administra SID (Nachreiner y col., 1993) Figura 1. Se debe revalorar cada 4 a 8 semanas, durante los primeros 6 meses de tratamiento y en caso de AJUSTE de la dosis, al cabo de 15 días después del mismo (Dixon y col., 2002; Scott-Moncrieff, 2010). Una vez alcanzada la dosis de mantenimiento, los controles podrán realizarse bianualmente (Mooney y Shield, 2012). El éxito del tratamiento está

asociado a que el valor de T4 y TSH estén próximos al límite superior e inferior del rango de referencia respectivamente (Castillo, 2011; Mooney y Shield, 2012). La medida de la concentración de TSH circulante permite constatar el cumplimiento y eficacia del tratamiento a largo plazo, en tanto la concentración de T4T proporciona información del tratamiento realizado el mismo día (Ferguson y Hoenig, 1997; Dixon y col., 2002). El fracaso terapéutico del hipotiroidismo puede deberse al diagnóstico erróneo del mismo, dosis inadecuada de levotiroxina (Mooney, 2017), mal absorción de T4 a nivel gastrointestinal o la falta de cumplimiento en la terapia por parte de los propietarios (Scott-Moncrieff, 2010).

4.II.8. Pronóstico de la enfermedad

El pronóstico en perros adultos tratados correctamente es excelente. Todas las alteraciones asociadas al hipotiroidismo son reversibles, exceptuando algunos de los cambios neurológicos (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005). La resolución de los signos clínicos en cachorros con hipotiroidismo congénito depende de la edad a la que se inicia el tratamiento (Castillo, 2011).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hipotiroidismo es la endocrinopatía más frecuente en caninos en Europa, Estados Unidos y Latinoamérica, siendo además, la de mayor incidencia dentro de las patologías tiroideas (Scarlett, 1994; Chastain y Panciera, 1995; González y Serrano, 2017).

El hipotiroidismo representa un desafío en la práctica clínica, los signos clínicos del canino hipotiroideo son insidiosos y no específicos, compartiéndose con muchas otras patologías, lo que hace de extrema importancia el diagnóstico preciso de la hipofunción tiroidea por medio de los test hormonales (Braz Da Cruz y Manoel, 2014). El diagnóstico definitivo de esta endocrinopatía implicaría la valoración de hormonas tiroideas (T4T, T4L) y TSH (Ferguson, 1994; Kemppainen y Behrend, 2001; Hoh y Oh, 2006), junto con un diagnóstico clínico y bioquímica sanguínea completa (Dixon, 2004; Nelson y Couto, 2014). Sin embargo, la evaluación de la función tiroidea no siempre es sencilla. Para arribar a un diagnóstico certero, cada laboratorio debería generar sus propios valores de referencia. La variabilidad entre poblaciones de referencia y entre técnicas e instrumental empleado para la determinación de los mismos, pueden determinar que los valores reportados en la bibliografía internacional no coincidan con los resultados de la población local. Por otra parte, a nivel internacional, se ha propuesto que en perros eutiroideos existen numerosos factores fisiológicos (raza, género, talla y edad) que podrían afectar los niveles séricos de las hormonas y metabolitos (colesterol y triglicéridos) utilizados para el diagnóstico de hipotiroidismo (Coppo y col., 2003; Pasquini y col., 2008; Scott-Moncrieff y col., 2012; Hegstad-Davies y col., 2015). En este sentido, existen numerosos estudios en humanos en donde factores como el género y la edad son tenidos en cuenta a la hora de establecer los niveles de corte de las hormonas mencionadas (Hollowell y col., 2002; Hubl y col., 2002; González-Segrado y Martin, 2004; Kratzsch y col., 2005; Sriphrapadang y col., 2014; Ehrenkranz y col., 2015). Sin embargo en caninos hasta el momento son escasos los reportes que consideran la partición de los rangos de referencia en base a estas variables (Sheerer y col., 2013; Hegstad-Davies y col., 2015; Nunes, 2017). El uso de valores de corte únicos inadecuados podría disminuir la precisión del diagnóstico de hipotiroidismo canino, sobre todo en etapas tempranas de la enfermedad (hipotiroidismo subclínico).

Esta tesis tiene por cometidos: 1) Investigar si los valores de corte utilizados actualmente para las hormonas y metabolitos implicados en el diagnóstico de hipotiroidismo varían de acuerdo a determinadas características fisiológicas del animal (raza, género, talla, edad) en una población de caninos clínicamente sanos. 2) Establecer valores de corte específicos, propios del laboratorio, en base a las características fisiológicas del animal que impacten en la concentración de dichas hormonas y metabolitos, permitiendo una mejor interpretación de los resultados de los test de laboratorio y un diagnóstico precoz. 3) Determinar la proporción de animales hipotiroideos confirmados por valoración hormonal de la casuística de casos hipotiroideos presuntivos recibidos en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal durante los años 2013-2016, utilizando valores de corte de la referencia internacional (IRI) y los valores de corte específicos, propios del laboratorio (IRE).

4. HIPÓTESIS

Factores como el género, la edad y la raza tienen un efecto significativo en la concentración sérica de las hormonas (T4T, T4L, TSH) y metabolitos (colesterol y triglicéridos) utilizados para el diagnóstico de hipotiroidismo canino. El uso de intervalos de referencia específicos de género y edad para cada hormona y metabolito modifica la proporción de caninos presuntivos hipotiroideos confirmados.

5. OBJETIVOS

7.I. General

Contribuir al conocimiento del estado tiroideo endocrino-metabólico en caninos clínicamente sanos para arribar a un correcto diagnóstico del hipotiroidismo.

7.II. Específicos

7.II.1. Objetivo específico 1 A

Determinar las concentraciones de T4T, T4L, TSH, colesterol y triglicéridos en perros clínicamente sanos y analizar si estas varían con el género, la talla y la edad de los caninos.

7.II.2. Objetivo específico 1 B

En base a los resultados obtenidos en el objetivo específico 1A, determinar los intervalos de referencia específicos (IRE) correspondientes a dichas hormonas y metabolitos para cada categoría.

7.II.3. Objetivo específico 2

Determinar si las concentraciones séricas de las hormonas utilizadas para el diagnóstico de hipotiroidismo canino (T4T, T4L y TSH), así como colesterol y triglicéridos difieren en las razas Bulldog (francés e inglés) al compararlas con dos grupos control (Ovejero Alemán y mestizos) y si el género afecta dichas concentraciones.

7.II.4. Objetivo específico 3

Considerando la base de datos de caninos presuntivos hipotiroideos (n=1500) determinar la proporción de casos que confirman diagnóstico de hipotiroidismo utilizando los IRE nacionales para cada hormona y cada categoría, y compararlo con el valor de corte único internacional para la población canina general.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos comprendidos en este estudio fueron avalados por el Comité de Ética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Además, se contó con el consentimiento de los propietarios de los caninos que participaron en la investigación.

8.I. Objetivo específico 1 A

Determinar las concentraciones de T4T, T4L, TSH, colesterol y triglicéridos en perros clínicamente sanos y analizar si estas varían con el género, la talla y la edad de los caninos.

Diseño experimental

Se tomaron muestras de sangre de 270 caninos de razas puras y mestizos clínicamente sanos (144 hembras intactas y 126 machos intactos). Los mismos se categorizaron en tres grupos etarios: grupo de cachorros: ≥ 3 meses a 1 año de edad ($n = 73$), grupo de adultos jóvenes: > 1 año ≤ 5 años ($n = 116$) y grupo de adultos mayores: > 5 años ≤ 10 años ($n = 81$). Los caninos también se dividieron en tres grupos de acuerdo a su talla, ≤ 15 kg de peso corporal (pequeños), > 15 a 29 kg (talla medianos) y los de más de 29 kg fueron considerados como perros de talla grande. Esta clasificación se basó en las cuatro categorías propuestas por el American Kennel Club (AKC), según los estándares de peso por raza. Los perros mestizos con menos de 15 meses de edad se excluyeron de esta categorización de talla; ya que al no poder predecir su tamaño futuro, esta es la edad máxima a la que se alcanza el peso corporal en un canino adulto (Hawthorne y col., 2004). Los caninos fueron sometidos a un ayuno de 8 horas previo a la toma de la muestra y se consideraron clínicamente sanos en función de su historia clínica, anamnesis y examen físico. Los criterios de inclusión fueron ausencia de signos clínicos en el momento de la extracción de sangre y ausencia de antecedentes de enfermedad. Se excluyeron las hembras preñadas o

en lactación, así como los caninos castrados de ambos sexos. Además se excluyeron los perros que recibieran medicamentos que afecten los niveles séricos de hormonas tiroideas, TSH, colesterol y triglicéridos dentro de los 3 meses previos a la participación (glucocorticoides, AINES, anticonvulsivantes, sulfonamidas u otros). Los propietarios de los animales debieron completar un cuestionario de forma obligatoria, previo a la extracción de sangre, a fin de contar con otra fuente para evaluar los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente. La toma de muestra de sangre se realizó en clínicas veterinarias y criaderos de todo el país mediante venopunción de la vena cefálica en tubos sin anticoagulante. Los sueros se centrifugaron (3000 rpm durante 15 minutos) y los sueros obtenidos se conservaron a -20 ° C hasta realizar los análisis correspondientes.

Determinaciones bioquímicas y hormonales

Los análisis hormonales y bioquímicos se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República del Uruguay. Las concentraciones séricas de T4T, T4L y TSH se determinaron mediante inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida (IMMULITE 1000), utilizando kits comerciales (Siemens, Diagnostic Product Corporation, Los Ángeles CA, EE. UU.). La sensibilidad del ensayo para T4Tc fue de 0.12 µg/dL. Los coeficientes de variación intra e interensayo para el control comercial tiroideo canino 1 (0.87 µg/dL) y 2 (1.61 µg/dL) (Siemens, Diagnostic Product Corporation, Los Ángeles CA, EE. UU.) fueron inferiores al 5%. La sensibilidad del ensayo T4L fue de 0.13 ng/dL y los coeficientes intra e interensayo para el control comercial 1 (0.68 ng/dL) y 2 (1.76 ng/dL) (Lipocheck Immunoassay Plus Control Kit, Bio-Rad) fueron menores de 5%. La sensibilidad del ensayo de TSH fue de 0.01 ng/mL y los coeficientes de variación intra e interensayo para el control comercial de tiroides canino 1 (0.24 ng/mL) y 2 (2.98 ng/mL) (Siemens, Diagnostic Product Corporation, Los Ángeles CA, EE. UU.) fueron inferiores al 5%.

Las concentraciones de colesterol y triglicéridos se analizaron por espectrofotometría (A25, Biosystems) utilizando kits comerciales Biosystems S.A., Barcelona (España). Los coeficientes de variación intraensayo para los controles comerciales (Biochemistry control serum I y II, Biosystems) para ambos metabolitos fueron menores al 10%.

Estudio estadístico

Se construyó una base de datos elaborada a partir de los resultados de la concentración sérica T4T, T4L, TSH, Col y TG y los datos recabados de los animales sanos (n=270), los cuales fueron agrupados por talla, género, edad y raza. El Software utilizado para el análisis estadístico fue R (R Development Core Team, 2016).

Antes de proceder a estudios de estadística inferencial, se realizó un análisis descriptivo de la muestra de animales sanos (n=270) en base a las variables de respuesta (niveles séricos de T4T, T4L, TSH, colesterol (Col) y triglicéridos (TG)). Para ello se calcularon medidas de frecuencia y se realizaron histogramas y diagramas de caja para cada hormona y metabolito y para cada categoría de la variable independiente en estudio (talla, género, edad).

Con el fin de analizar el posible efecto de la talla, género y edad sobre las concentraciones de las hormonas y metabolitos mencionados, se procedió al ajuste de un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) para cada uno (Bates y col., 2015). Esta decisión se tomó en base a que los datos en muchos casos no presentaban una distribución normal y que la raza de los caninos fue incluida en el modelo como efecto aleatorio, ya que las 29 razas caninas comprendidas en el estudio no se encontraban igualmente representadas. Los GLMM son reportados como la mejor herramienta para analizar datos no normales que involucren efectos aleatorios (Bolker y col., 2009; Harrison y col., 2018). Para incluir las posibles interacciones entre las variables de efecto fijo en el modelo se tuvo en cuenta el criterio biológico y la observación de los gráficos de interacción.

Se realizó un test de bondad de ajuste, en el cual, en base al criterio de información de Akaike se evaluó qué tipo de distribución se ajustaba mejor a la de nuestros datos (gamma, normal, logarítmica) (Delignette-Muller y Dutang, 2015). La función de enlace utilizada para cada modelo fue la más "típica" de acuerdo a cada distribución implementada. En el proceso de armado del modelo se ajustó para cada variable (género, talla, edad) un modelo sin el efecto fijo cuya significancia se deseaba estimar, comparándolo por razón de verosimilitud (Zeileis y Hothorn, 2002) con el modelo inicial que incluía todas las variables en estudio. Luego de obtener el modelo final se procedió al análisis de residuos del mismo. Dado el caso, para cada modelo, el test a posteriori utilizado para encontrar las diferencias significativas entre más de dos categorías de determinado efecto fijo, fue el test de Tukey. En base al modelo final, se

calcularon los valores estimados de concentración sérica de cada hormona para cada categoría cada valor fue re-transformado en el caso de que la función de enlace utilizada lo requiriera, para su mejor interpretación. Se calculó el intervalo de confianza del 95% para cada estimado del modelo para T4L y TSH, mientras que para calcular el IC95% de T4T se utilizó el método bootstrap paramétrico (con 1000 muestras). Además, la varianza y desviación estándar del efecto aleatorio fue estimada para cada modelo. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

8.II. Objetivo específico 1 B

En base a los resultados obtenidos en el objetivo específico 1A, determinar los intervalos de referencia específicos (IRE) correspondientes a dichas hormonas y metabolitos para cada categoría.

Con el fin de cumplir con el objetivo específico 1B, los resultados obtenidos de los GLMM fueron utilizados como guía en la decisión de calcular rangos de referencia por subgrupos de género y edad para cada hormona (Harris y Boyd, 1990). Todas las determinaciones de los intervalos de referencia se realizaron acorde a lo reportado por Finnegan (2014), siendo calculados como el conjunto de valores cuyos límites corresponden a los percentiles 2.5 y 97.5 con respecto a la mediana. Considerando la implicancia en el diagnóstico de hipotiroidismo canino, se calculó el límite de referencia superior e inferior para las concentraciones séricas de T4T y T4L, y se obtuvo sólo el límite superior del intervalo de referencia para la concentración sérica de TSH. Los métodos estadísticos que se utilizaron para determinar los límites de referencia se seleccionaron en función del número y distribución de los valores de referencia (Friedrichs y col., 2012). Los intervalos de confianza (IC, 90%) alrededor de los límites de referencia superior e inferior para cada rango se calcularon utilizando el método bootstrap.

8.III. Objetivo específico 2

Determinar si las concentraciones séricas de las hormonas utilizadas para el diagnóstico de hipotiroidismo canino (T4T, T4L y TSH), así como colesterol y triglicéridos difieren en las razas Bulldog (francés e inglés) al compararlas con dos grupos control (Ovejero Alemán y mestizos) y si el género afecta dichas concentraciones.

Diseño experimental

La población seleccionada comprendió 67 perros clínicamente sanos intactos, con edades entre 1 y 9 años; 20 de estos animales eran Bulldog Inglés de ambos géneros (9 machos y 11 hembras) y 17 eran Bulldog Francés de ambos géneros (6 machos y 11 hembras). Dos sub-poblaciones de perros adultos se utilizaron como grupos control, uno de raza Pastor Alemán (7 machos y 8 hembras) y otro grupo de caninos mestizos (8 machos y 7 hembras). Todos los caninos comprendidos en este estudio reunían los criterios de inclusión y exclusión mencionados anteriormente. La toma y procesamiento de las muestras se llevo a cabo tal y como se describe en el objetivo específico 1A.

Determinaciones hormonales y bioquímicas

Se determinó la concentración sérica de T4T, T4L, TSH, Col y TG de la misma forma como se describió en el estudio precedente (Objetivo específico 1A).

Estudio estadístico

Las concentraciones séricas de T4T, T4L, TSH, Col y TG se analizaron mediante el procedimiento mixto (PROC MIXED Statistical Analysis System, SAS), que incluyó a la raza, el género y sus interacciones como efectos fijos en el modelo. La edad se incluyó como una covariable en el modelo. Se utilizó una transformación logarítmica natural en las concentraciones de TSH y TG para obtener una distribución normal para los análisis. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

8.IV. Objetivo específico 3

Considerando la base de datos de caninos presuntivos hipotiroideos (n=1500) determinar la proporción de casos que confirman diagnóstico de hipotiroidismo utilizando los IRE nacionales para cada hormona y cada categoría, y compararlo con el valor de corte único internacional para la población canina general.

Previamente a dar cumplimiento a este objetivo, se llevó a cabo un estudio descriptivo retrospectivo la base de datos de caninos con diagnóstico presuntivo de hipotiroidismo (n=1500), con el fin de conocer mejor la población en estudio. Los caninos se agruparon por frecuencia de género, edad, talla, raza y año de ingreso, con los respectivos resultados de concentración sérica de T4T, T4L y TSH. Las edades se categorizaron en 5 grupos: de 0 a 1 año; >1 año a 5 años; >5 años a <10 años; ≥10 años y “otros” en el caso en que no se contara con información de edad. Acorde a la talla de los caninos se conformaron tres grupos, basados en las cuatro categorías propuestas por el American Kennel Club (Ver Materiales y Métodos del objetivo específico 2B). Todos los casos que no contaran con información de talla fueron incluidos en la categoría “otros”. Se registraron 64 razas; las cuales se agruparon por frecuencia, manteniéndose como tales las razas con 50 caninos o más (Beagle, el Bóxer, el Caniche, el Cocker, el Golden Retriever, el Labrador Retriever y mestizos); mientras que las razas con menor frecuencia de aparición se agruparon en la categoría denominada “menor o igual a 50”.

Dentro de la base de datos de caninos ingresados como presuntivos (n=1500), de los que se conoce el género (n=1482), las hembras representaron el 59% y los machos el 41% del total de individuos. De los que se conoce la edad (n=1360), los caninos de edad 1 (<1 año de edad) representaron el 5.4%; los de edad 2 (>1≥5 años) representaron el 35%; los de edad 3 (>5<10 años) el 35.7%; y los de edad 4 (≥10 años) representaron el 23.9% de los animales. De los que se conoce la talla (n=1143), los caninos de talla 1 (≤15 kg) representaron el 26.3%; los de talla 2 (>15 a 29 kg) representaron el 15.2%; y los de talla 3 (>29 kg) un 58.4%.

En cuanto a la distribución de edades por género, de las hembras (n=801) y machos (n=549) de los que se conoce la edad, el 4.1% (n=33) de las hembras y el 6.7% (n=37) de los machos fueron menores al año de edad, el 35.3% (n=283) de las hembras y el 34.6% (n=190); de los machos tuvieron entre >1≥5 años; el 36.4% (n=292) de las

hembras y el 34.8% (n=191) de los machos >5 <10 años; y el 24.2% (n=193) de las hembras y el 23.9% (n=131) de los machos tuvieron ≥ 10 años de edad.

En cuanto a la distribución de las tallas por género, de las hembras (n=657) y machos (n=474) de los que se conoce la talla, un 26.3% (n=173) de las hembras y un 26.4% (n=125) de los machos correspondieron a la talla 1 (≤ 15 kg); el 14.9% (n=98) de las hembras y el 15.4% (n=73) de los machos correspondieron a la talla 2 (>15 a 29kg); y el 58.8% (n=386) de las hembras y el 58.2% (n=276) de los machos correspondieron a la talla 3 (>29kg).

En relación a la raza de los animales, de un total de 1406 caninos de los que se conoce su raza, un 80.9 % fueron de raza pura y un 19.1% mestizos (Figura 5 A). Dentro de las razas puras ingresadas, las de mayor frecuencia (≥ 50 animales por raza) (n=575) fueron el Golden retriever con un 31.7%; el Labrador retriever con un 27.8 %; el Caniche con un 13.4%; el Cocker 9.4%; el Bóxer 9% y el Beagle 8.7% (Figura 5 B).

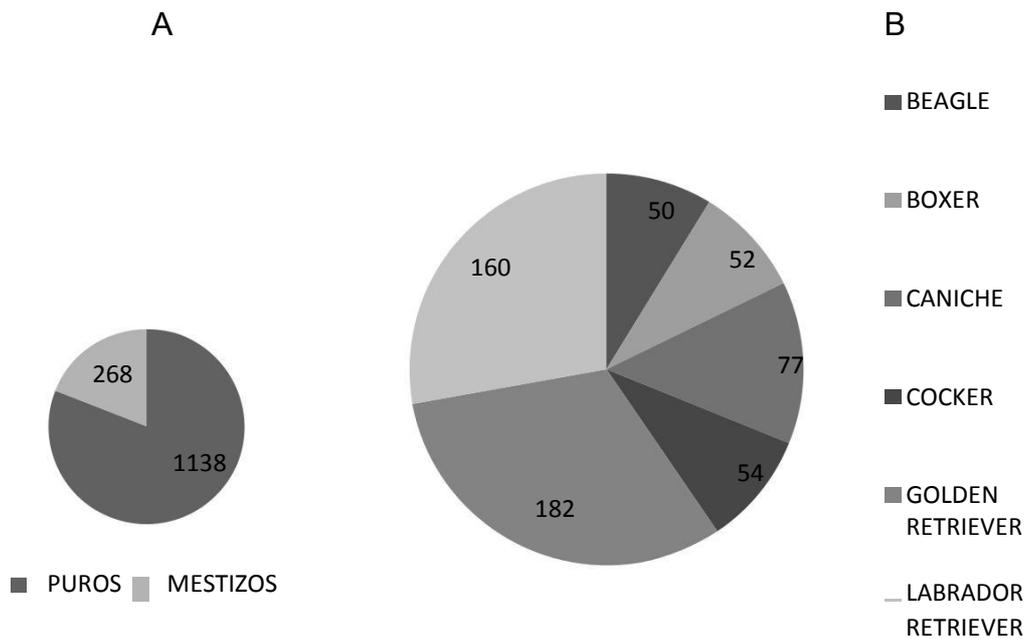


Figura 5. A: Porcentaje de puros y mestizos; B: porcentaje de razas de los caninos ingresados como presuntivos de hipotiroidismo al Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria (UdelaR) desde el año 2013 al 2016.

Al evaluar el número de caninos ingresados como presuntivos pacientes hipotiroideos al LEMA a lo largo de los años, este ha ido en aumento, siendo de 234 animales en el período 2013-2014, de 283 animales en el período 2014-2015 y de 450 animales en el período 2015-2016.

Para dar cumplimiento al objetivo 3 se determinó la proporción de caninos ingresados como presuntivos que fueron diagnosticados como hipotiroideos en base al Intervalo de Referencia Internacional (IRI) único para cada hormona (T4T < 1.5 µg/dL; T4L < 0.7ng/dL; TSH > 0.43 ng/mL) (Scott-Moncrieff y col., 1998; Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005; Roover y col., 2006).

Además, se determinó la proporción de caninos diagnosticados por los Intervalos de Referencia Específicos de género y edad (IRE) obtenidos en este estudio, con el fin de contrastar ambas proporciones. Por otro lado se comparó la proporción de caninos confirmados para cada método diagnóstico (T4T, T4L, TSH, T4T+TSH) al utilizar el IRI vs los IRE para cada hormona. Los valores fueron normalizados para cada categoría de género y edad de la base de datos de caninos presuntivos a los que se les midió dichas hormonas. Para determinar si las diferencias entre proporciones de animales confirmados mediante los distintos valores de corte eran significativas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. Los valores de P < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

9.I. Resultados Objetivo específico 1A

Determinar las concentraciones de T4T, T4L, TSH, colesterol y triglicéridos en perros clínicamente sanos y analizar si estas varían con el género, la talla y la edad de los caninos.

Tiroxina Total (T4T)

El género y la edad tuvieron efecto sobre la concentración sérica de T4T ($P=0.043$, $P=0.0009$), siendo los únicos incluidos en el modelo final para esta hormona: $T4T \sim \text{género} + \text{edad}$ (efecto aleatorio: raza). No se encontró un efecto significativo de la talla ni de las interacciones $\text{talla} * \text{género}$, $\text{talla} * \text{edad}$ y $\text{género} * \text{edad}$ sobre los niveles de T4T, excluyéndolos del modelo final.

Las hembras presentaron mayores niveles de T4T sérica que los machos (1.89 ± 0.03 $\mu\text{g/dL}$ vs 1.74 ± 0.03 $\mu\text{g/dL}$). La concentración de T4T disminuyó con la edad, encontrando mayores niveles en los cachorros (2.0 ± 0.03 $\mu\text{g/dL}$) que en los adultos jóvenes (1.75 ± 0.02 $\mu\text{g/dL}$) ($P=0.0012$) y adultos mayores (1.71 ± 0.02 $\mu\text{g/dL}$) ($P < 0.0001$), no presentándose diferencias entre estas dos últimas categorías ($P < 0.05$).

Tiroxina libre (T4L)

El género y la edad tuvieron efecto sobre la concentración sérica de T4L ($P=0.0017$, $P < 0.0001$), siendo los únicos efectos fijos incluidos en el modelo final para esta hormona: $T4L \sim \text{género} + \text{edad}$ (efecto aleatorio: raza). La talla y las interacciones $\text{talla} * \text{género}$, $\text{talla} * \text{edad}$ y $\text{edad} * \text{género}$ no tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de T4L.

Las hembras presentaron mayores niveles de T4L sérica que los machos (1.47 ± 0.05 ng/dL vs 1.34 ± 0.05 ng/dL). Mientras que la concentración de T4L disminuyó con la edad, encontrando mayores niveles en los cachorros (1.52 ± 0.03 ng/dL) que en los

adultos jóvenes (1.39 ± 0.03 ng/dL) ($P=0.005$) y adultos mayores (1.31 ± 0.03 ng/dL) ($P < 0.001$), no presentándose diferencias entre estas dos últimas categorías ($P > 0.05$).

Hormona estimulante de la tiroides (TSH)

La edad tuvo efecto sobre la concentración de TSH ($P=0.019$), siendo el modelo final para esta hormona: $\log TSH \sim \text{edad}$ (efecto aleatorio: raza). No se encontró un efecto significativo del género, la talla y las interacciones género*edad, talla*edad y edad*género sobre la concentración de esta hormona. Los niveles séricos de TSH aumentaron con la edad, encontrándose diferencias únicamente entre cachorros (0.10 ± 0.02 ng/mL) y adultos mayores (0.14 ± 0.03 ng/mL) ($P= 0.015$).

Colesterol (Col) y Triglicéridos (TG)

No se encontró un efecto significativo de la talla, género, edad e interacciones talla*género y talla*edad sobre la concentración sérica de Col y TG.

9.II. Resultados Objetivo específico 1B

En base a los resultados obtenidos en el objetivo específico 1A, determinar los intervalos de referencia específicos (IRE) correspondientes a dichas hormonas y metabolitos para cada categoría.

Los intervalos de referencia calculados para cada hormona y categoría de efecto fijo se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Intervalos de referencia del 95% para las concentraciones séricas de T4T, T4L y TSH en caninos por género y edad.

Género	n	Distribución	Método	LIR	LSR
T4T (µg/dL)					
Hembras (cachorros)	37	G	P	1.32 (1.12-1.53)	3.03 (2.83-3.24)
Hembras (adultos jóvenes)	65	G	R	0.99 (0.88-1.12)	2.99 (2.85-3.22)
Hembras (adultos mayores)	42	NG	R (TL)	0.82 (0.58-0.97)	2.93 (2.58-3.32)
Machos (cachorros)	36	G	P	1.17 (0.96-1.38)	2.94 (2.73-3.15)
Machos (adultos jóvenes)	51	NG	R (TL)	0.90 (0.82-0.91)	3.30 (3.22-3.76)
Machos (adultos mayores)	39	NG	R (TL)	0.80 (0.68-1.06)	3.17 (2.99-3.40)
Todos	270	-	NP	0.91(0.86-0.94)	3.10 (2.94-3.31)
T4L (ng/dL)					
	270				
Hembras (cachorros)	37	NG	R	0.91 (0.73-1.04)	2.15 (1.96-2.34)
Hembras (adultos jóvenes)	65	G	R	0.78 (0.64-0.88)	2.08 (1.97-2.17)
Hembras (adultos mayores)	42	G	R	0.75 (0.60-0.89)	1.95 (1.82-2.08)
Machos (cachorros)	36	G	P	0.88 (0.75-1.02)	2.03 (1.89-2.17)
Machos (adultos jóvenes)	51	G	R	0.74 (0.62-0.83)	1.97 (1.87-2.09)
Machos (adultos mayores)	39	G	R	0.69 (0.58-0.79)	1.68 (1.58-1.79)
Todos	270	-	NP	0.83 (0.77-0.85)	2.08(1.96-2.24)
TSH (ng/mL)					
Cachorros	73	NG	R (TL)	-	0.27 (0.22-0.32)
Adultos jóvenes	116	NG	R (TL)	-	0.31 (0.27-0.35)
Adultos mayores	81	NG	R (TL)	-	0.33 (0.27-0.39)
Todos	270	-	NP	-	0.37 (0.33-0.41)

G = Gaussiana, NG = No-Gaussiana; P=Paramétrico; R = Robusto; NP = No paramétrico; TL= Transformación logarítmica; LIR =Límite de referencia inferior; LSR = Límite de referencia superior. Los números dentro de los paréntesis curvos corresponden al intervalo de confianza del 90% alrededor del límite de referencia, calculado utilizando el método bootstrap.

9.III. Resultados Objetivo específico 2

Determinar si las concentraciones séricas de las hormonas utilizadas para el diagnóstico de hipotiroidismo canino (T4T, T4L y TSH), así como colesterol y triglicéridos difieren en las razas Bulldog (francés e inglés) al compararlas con dos grupos control (Ovejero Alemán y mestizos) y si el género afecta dichas concentraciones.

Los niveles séricos de las variables estudiadas en las razas Bulldog francés e inglés, al igual que en los grupos control (Ovejeros Alemanes y mestizos) se encontraban dentro de los rangos de referencia internacionales para la población canina general. La concentración media de T4T y T4L séricas varió significativamente entre razas (Tabla 3). La raza Bulldog inglés presentó mayores niveles séricos de T4T en comparación con la raza Ovejero Alemán ($P=0.0003$) y mestizos ($P=0.0016$). La raza Bulldog francés presentó solo concentraciones más altas de T4T que los perros Ovejero Alemán ($P=0.0469$). La raza Bulldog inglés y francés presentaron concentraciones séricas de T4L significativamente más altas que los Ovejeros Alemanes ($P<0.0001$ y $P=0.001$ respectivamente) y mestizos ($P=0.0039$ y $P=0.0431$ respectivamente). No se encontraron diferencias en la concentración sérica de T4T y T4L entre las razas Bulldog inglés y francés. Entre los grupos control, no se encontraron diferencias en los niveles séricos de T4T y T4L. Las hembras presentaron mayores niveles séricos de T4L que los machos (Tabla 4), mientras que la concentración de T4T no se vio afectada por el género. Para los niveles séricos de TSH, Col y TG, no se encontraron diferencias entre razas o géneros. No hubo una interacción significativa entre los efectos de la raza y el género para las concentraciones de las hormonas y metabolitos en estudio.

Tabla 3. Concentraciones séricas de T4T, T4L, TSH, Col y TG en perros clínicamente sanos de diferentes razas.

	Bulldog Inglés	Bulldog Francés	Ovejero Alemán	Mestizos	P
Variable					
T4T (µg/dL)	2.54 ± 0.13 a	2.23 ± 0.15 ac	1.81 ± 0.14 bc	1.90 ± 0.14 c	0.0012**
T4L (ng/dL)	1.51 ± 0.05 a	1.44 ± 0.06 a	1.14 ± 0.06 b	1.26 ± 0.06 b	<0.0001***
TSH (ng/mL)	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.6240
COL (mg/dL)	203.74 ± 9.73	200.69 ± 11.34	194.71 ± 12.23	230 ± 11.20	0.1441
TG (mg/dL)	76.64 ± 8.61	80.44 ± 10.04	67.89 ± 10.82	59.26 ± 9.10	0.4327

Los valores se expresan como la media ± desvío estándar (SEM). T4T: Tiroxina total canina; T4L: Tiroxina libre; TSH: Hormona estimulante de la tiroides canina; COL: Colesterol; TG: Triglicéridos. ** P <0.001; *** P <0.0001. Letras diferentes indican diferencias significativas P<0.05.

Tabla 4. Concentraciones séricas de T4T, T4L, TSH, colesterol y triglicéridos en perros clínicamente sanos (n = 67) de diferentes géneros.

	Hembra	Macho	P
Variable			
T4T ($\mu\text{g/dL}$)	2.17 \pm 0.09	2.07 \pm 0.10	0.4703
T4L (ng/dL)	1.40 \pm 0.04 a	1.27 \pm 0.04 b	0.0309*
TSH (ng/mL)	0.11 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.8455
COL (mg/dL)	217.62 \pm 7.35	196.95 \pm 8.37	0.0701
TG (mg/dL)	71.91 \pm 6.50	70.21 \pm 7.41	0.8642

Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar (SEM). T4T: Tiroxina total; T4L: Tiroxina libre; TSH: Hormona estimulante de la tiroides; COL: Colesterol; TG: Triglicéridos. * $P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias significativas $P < 0.05$.

9.IV. Resultados Objetivo específico 3

Considerando la base de datos de caninos presuntivos hipotiroideos (n=1500) determinar la proporción de casos que confirman diagnóstico de hipotiroidismo utilizando los IRE nacionales para cada hormona y cada categoría, y compararlo con el valor de corte único internacional para la población canina general.

Los resultados se obtuvieron comparando la proporción de caninos confirmados hipotiroideos mediante los IRE obtenidos en este estudio vs el IRI utilizado actualmente en el laboratorio, único para cada hormona (Tabla 5).

Tabla 5. Límites inferiores y superiores de los Intervalos de referencia para las concentraciones séricas de T4T T4L y TSH en caninos por género y edad.

Género y Edad	LIR (IRE)	LIR (IRI)
T4T (µg/dL)		
Hembras (cachorros)	1.32	1.50
Hembras (adultos jóvenes)	0.99	
Hembras (adultos mayores)	0.82	
Machos (cachorros)	1.17	
Machos (adultos jóvenes)	0.90	
Machos (adultos mayores)	0.80	
	LIR (IRE)	LIR (IRI)
T4L (ng/dL)		
Hembras (cachorros)	0.91	0.70
Hembras (adultos jóvenes)	0.78	
Hembras (adultos mayores)	0.75	
Machos (cachorros)	0.88	
Machos (adultos jóvenes)	0.74	
Machos (adultos mayores)	0.69	
Edad	LSR (IRE)	LSR (IRI)
TSH (ng/mL)		
Cachorros	0.27	0.43
adultos jóvenes	0.31	
adultos mayores	0.33	

LIR: Límite inferior de referencia; LSR: Límite superior de referencia; IRE: Intervalo de referencia específico de género y edad; IRI: Intervalo de referencia Internacional único.

Caninos confirmados a partir del IRI e IRE para cada test diagnóstico

En cuanto al diagnóstico a partir del IRI, se encontró una mayor proporción de caninos confirmados por T4T en relación a los confirmados por T4L ($P < 0.0001$) o TSH ($P < 0.0001$). La proporción de confirmados para cada test individual (T4T, T4L, TSH) fue mayor a la obtenida a partir de la medición conjunta de T4T y TSH ($P < 0.0001$; $P = 0.013$; $P = 0.014$ respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre aquellos confirmados mediante T4L vs TSH (Tabla 6).

Al comparar la proporción de caninos confirmados a partir de los IRE para cada test diagnóstico (T4T, T4L y TSH), no se encontraron diferencias significativas, con la excepción de T4T vs TSH, siendo mayor para T4T ($P=0.023$). La proporción de caninos confirmados mediante cada test individual (T4T, T4L y TSH) fue mayor que la obtenida a partir de T4T y TSH ($P < 0.0001$) (Tabla 6).

Por otro lado, se encontraron diferencias entre la proporción de caninos confirmados a partir de los IRE vs IRI para T4T, TSH y (T4TyTSH) ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P=0.030$ respectivamente). Mientras que no se encontraron diferencias significativas en este mismo sentido para los confirmados mediante T4L (Tabla 6).

Tabla 6. Proporción de caninos confirmados hipotiroideos a partir de los test diagnósticos T4T, T4L, TSH, T4T+TSH utilizando el IRI y los IRE

	T4T	T4L	TSH	T4T y TSH
IRI	(238/558) 42.6%	(65/345) 18.8%	(161/913) 17.6%	(63/500) 12.6%
	T4T	T4L	TSH	T4Ty TSH
IRE	(115/558) 20.6%	(74/345) 21.4%	(236/913) 25.8%	(42/500) 8.4%

IRE: Intervalo de referencia específico de género y edad; IRI: Intervalo de referencia Internacional único; T4T: Tiroxina total; T4L: Tiroxina libre; TSH: Hormona estimulante de la tiroides.

T4T

Las proporciones de hembras y machos adultos (jóvenes y mayores) confirmados hipotiroideos en función de los IRE para T4T fueron significativamente menores en comparación con las proporciones de los caninos de las mismas categorías confirmados a partir del IRI (Figura 6). No se encontraron diferencias significativas entre la proporción de cachorros (hembras y machos) confirmados a partir de los IRE vs IRI para T4T (Figura 6).

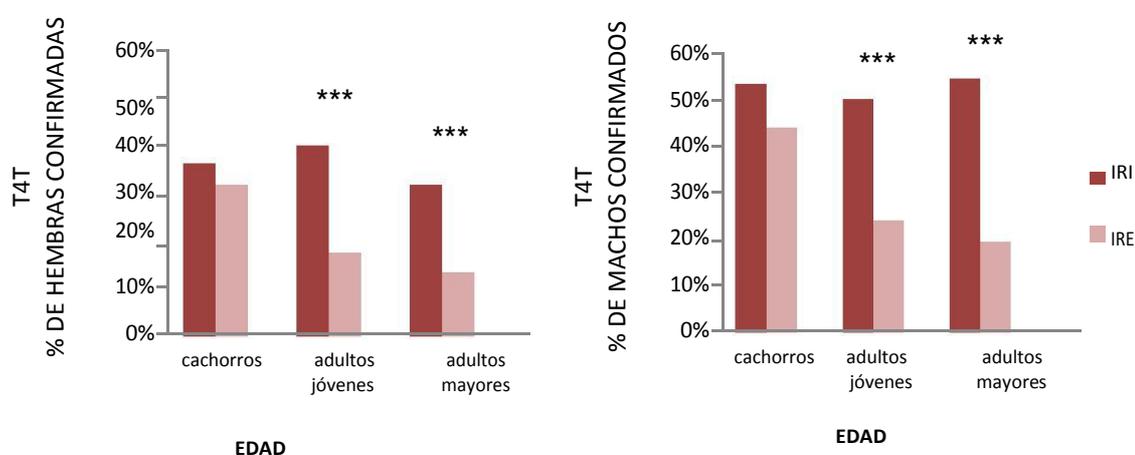


Figura 6. Porcentaje de hembras y machos diagnosticados hipotiroideos mediante IRI vs IRE para la T4T sérica. IRI: $[T4T] < 1.5 \mu\text{g/dL}$; IRE:

Hembras cachorras: $[T4T] < 1.32 \mu\text{g/dL}$; Adultas jóvenes: 0.99 , Hembras adultas mayores: $0.82 \mu\text{g/dL}$; Machos cachorros: $[T4T] < 1.17 \mu\text{g/dL}$; Machos adultos jóvenes: 0.90 , Machos adultos mayores: $0.80 \mu\text{g/dL}$. *** $P \leq 0.001$.

Los machos adultos (jóvenes y mayores) se encontraron en mayor proporción que las hembras de las mismas edades al ser diagnosticados mediante el IRI para T4T; esta diferencia perdió su significancia al utilizar los IRE (Tabla 7). Se observó un mayor descenso de confirmados en los machos al utilizar los IRE vs el IRI en adultos mayores ($P = 0.0494$) (Figura 6).

Tabla 7. Diferencias en la proporción de hembras y machos confirmados hipotiroideos por T4T utilizando el IRI vs los IRE

	confirmados por T4T (IRI)	P	confirmados por T4T (IRE)	P
Hembras cachorras	(8/21) 38.0%	0.238	(7/21) 33.3%	0.395
Machos cachorros	(17/31) 54.8%		(14/31) 45.2%	
Hembras adultas jóvenes				
Hembras adultas jóvenes	(52/153) 33.9%	0.0059	(28/153) 18.3%	0.223
Machos adultos jóvenes	(50/97) 51.5%		(24/97) 24.7%	
Hembras adultas mayores				
Hembras adultas mayores	(22/156) 33.3%	0.0003	(22/156) 14.1%	0.214
Machos adultos mayores	(56/100) 56.0%		(20/100) 20.0%	

IRE: Intervalo de referencia específico de género y edad; IRI: Intervalo de referencia Internacional único; T4T: tiroxina total.

T4L

No se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de hembras y machos adultos (jóvenes y mayores) confirmados mediante los IRE para T4L y los caninos de las mismas categorías, confirmados a partir del IRI (Figura 7). Debido al pequeño tamaño de muestra del grupo de cachorros (hembras y machos) en la población de presuntivos (n=8 y n=5 respectivamente), no se pudo comparar estadísticamente las proporciones para esta categoría confirmadas por los IRE vs IRI.

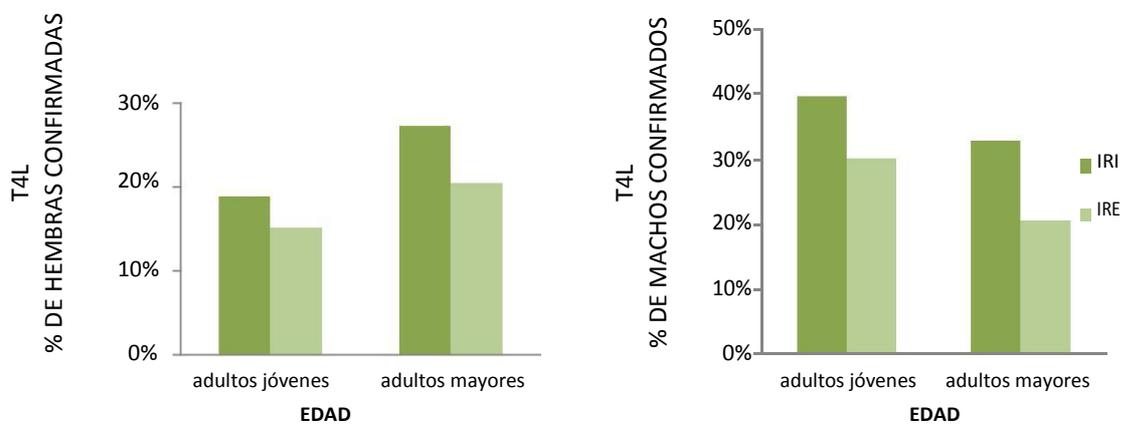


Figura 7. Porcentaje de hembras y machos diagnosticados hipotiroideos mediante IRI vs IRE para la T4L sérica. IRI: [T4L] <0.7 ng/dL); IRE: Hembras adultas jóvenes: 0.78 ng/dL; Hembras adultas mayores: 0.75 ng/dL; Machos adultos jóvenes: 0.74 ng/dL; Machos adultos mayores: 0.69 ng/dL.

TSH

Las proporciones de cachorros y adultos (jóvenes y mayores) confirmados hipotiroideos mediante los IRE para TSH fueron significativamente más altas en comparación con las proporciones de caninos confirmados a partir del IRI para dicha hormona (Figura 8).

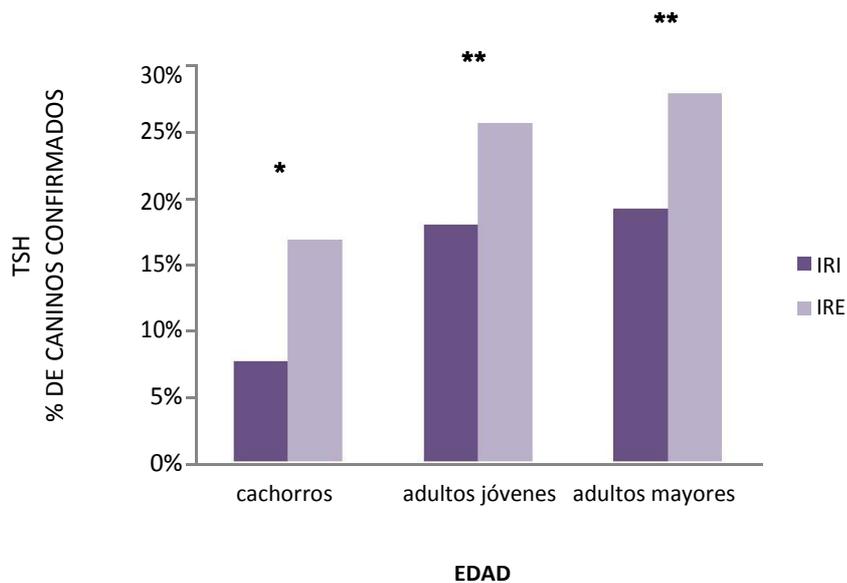


Figura 8. Porcentaje de caninos diagnosticados hipotiroideos mediante el IRI vs los IRE para la TSH sérica acorde a la edad. IRI: [TSH]>0.43; IRE: cachorros: 0.27 ng/mL; adultos jóvenes: 0.31 ng/mL adultos mayores: 0.33 ng/mL. * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01.

8. DISCUSIÓN

La presente tesis de maestría ha permitido profundizar en el área de conocimiento del estado tiroideo endocrino-metabólico en caninos clínicamente sanos, con el fin de llegar a un correcto diagnóstico del hipotiroidismo. Específicamente hemos aportado información respecto a como factores fisiológicos (edad, género, raza) pueden hacer variar la concentración sérica de las hormonas tiroideas y TSH en caninos clínicamente sanos. Este trabajo permitió generar rangos de referencia hormonales específicos de edad y género para nuestro laboratorio, y contrastar estos hallazgos con los valores de corte únicos para la especie canina manejados a nivel internacional.

En el presente estudio, el aumento de la edad se asoció con la disminución de la concentración sérica de T4T y T4L, y aumento de la concentración de TSH en caninos sanos. Este aumento en los niveles séricos de TSH, es consistente con lo reportado a nivel internacional. Hegstad-Davies y col. (2015) observaron que en caninos sanos la concentración de TSH aumentaba 0,01 ng/mL por cada mes de vida. En este mismo sentido Bhatti y col. (2006) demostraron en Beagles sanos, que los perros de 7 a 12 años presentaban concentraciones medias de TSH más altas que los más jóvenes. El aumento en los niveles de TSH podría ser una respuesta -por retroalimentación del eje H.H.T- a la disminución de los niveles séricos de hormonas tiroideas a medida que la edad aumenta; o debida a la alteración del parénquima de la glándula tiroides en la vejez o como consecuencia de algún desorden no tiroideo (Vi oiú y col., 2013). Como se mencionó anteriormente, los niveles de T4T y T4L disminuyeron con la edad. En nuestro trabajo, como se mencionó anteriormente, los niveles de T4T y T4L disminuyeron con la edad. Estos resultados son respaldados por varios trabajos en donde se observó como la concentración sérica de T4T y T4L era mayor en cachorros, declinando progresivamente durante la vida adulta (Ramírez y Osorio, 2009; Shiel y col., 2010; Scott-Moncrieff y col., 2012). En este mismo sentido, Hegstad -Davies y col. (2015) observaron que en caninos sanos la concentración de T4T y T4L descendían a razón de 0.004 µg/dL y 0.004 ng/dL por mes de edad respectivamente. Resultados similares se obtuvieron en un estudio en caninos sanos (n=292) donde las concentraciones mayores de T4T y T4L correspondían a animales menores a 1 año y de 1 año de edad, y las concentraciones más bajas a caninos de 10 años (Fialkovicová y col., 2012). Sin embargo, otros autores, si bien reconocen que existe

una tendencia a que la concentración de T4T descienda a medida que la edad avanza, no encontraron diferencias significativas entre categorías etarias para esta hormona (Mosallanejad y col., 2014; Patkar y col., 2014). Otros trabajos sólo encontraron diferencias al comparar perros adultos con gerontes (González y col., 1988). Las posibles razones que explican la discordancia de estos resultados podrían estar asociadas a los grupos etarios estudiados (Patkar y col., 2014), o a que no se controlaron algunos factores que afectan los niveles de hormonas tiroideas (Mosallanejad y col., 2014). Por otro lado, los altos niveles de T4T y T4L reportados en cachorros podrían ser atribuidos a los mayores requerimientos metabólicos en esta etapa de crecimiento. Es sabido que las hormonas tiroideas son esenciales para el desarrollo y crecimiento del organismo, siendo mayores las concentraciones en estas etapas que en la madurez (Reimers y col., 1990; Castillo y col., 1997). Una de las causas propuestas para explicar el descenso de las hormonas tiroideas con el envejecimiento son los cambios en la respuesta por parte de la glándula tiroidea a la estimulación de la TSH. En este mismo sentido, estudios en glándula tiroidea de ratón, demuestran la aparición gradual de folículos "fríos" con la edad; observándose una falla en el mecanismo de endocitosis de las hormonas tiroideas (Studer y col., 1978). El envejecimiento glandular también puede estar dado por atrofia, fibrosis o degeneración de la glándula tiroidea (Scott-Moncrieff y col., 2012). Además, la baja actividad tiroidea en la última etapa de la vida podría deberse a la presencia de tiroiditis subclínica u otras enfermedades concurrentes (Scott-Moncrieff y col., 2012).

El género afectó la concentración sérica de T4T y T4L, siendo mayor en hembras que en machos para ambas hormonas, mientras que no se encontró efecto sobre los niveles de TSH. Con respecto a lo reportado para la TSH, resultados similares fueron observados en un estudio que comprendió 693 perros intactos (Hegstad-Davies y col., 2015), y en la raza Saluki (Shiel y col., 2010), donde no se encontraron diferencias de género para esta hormona. Por el contrario, Pessina y col., (2014), en perros intactos de la raza Ovejero Alemán (n=57), reportaron mayores niveles de TSH en machos que en hembras.

Los mayores niveles séricos de T4T y T4L encontrados en hembras en nuestro trabajo concuerdan con lo reportado en otros estudios para diversas razas caninas (Shiel y col., 2010; Pessina y col., 2014; Hegstad-Davies y col., 2015). En contraposición, otros autores no encontraron diferencias entre géneros, siendo en parte atribuible a que no comprendieron fuentes de variación como la edad, la talla y/o la raza para el estudio de estas hormonas (Ramírez y Osorio, 2009; Patkar y col., 2014; Osorio y Suárez, 2016)

o si las incluyeron, fueron estudiadas en forma independiente (Mosallanejad y col., 2014). Si bien en caninos la información es escasa, Pessina y col. (2012) demostraron que el género afecta la expresión del receptor de TSH (TSH-R) y tiroglobulina (Tg) siendo mayor en hembras. Esta mayor sensibilidad al estímulo de la TSH en hembras se asocia a una mayor capacidad de secretar hormonas tiroideas.

Por otro lado, Krzyżewska-Młodawska y col. (2014), estudiaron el efecto de la gonadectomía en caninos machos y hembras libres de patología tiroidea, encontrando que ambos sexos castrados presentaban concentraciones de T4L similares, siendo más bajas que las encontradas en los animales intactos. Estos resultados reflejan la acción diferencial de las hormonas sexuales en la producción de hormonas tiroideas. La bibliografía sugiere que la función tiroidea de las hembras intactas debería ser evaluada en etapa de anestro y que los resultados de los estudios realizados en caninos pueden haber estado influenciados por el efecto del diestro en las perras. En este sentido, se han reportado niveles de hormonas tiroideas mayores en hembras en etapas de dominancia de la progesterona (diestro o preñez) en relación con hembras en anestro, proestro y hembras en lactación (Reimers y col., 1984; Feldman y Nelson, 2007). Si bien en caninos aún se desconoce el mecanismo de acción de la progesterona sobre la glándula tiroidea, en humanos se reportó que esta hormona posee un efecto directo sobre los tirocitos, estimulando la expresión de los genes que participan en la función tiroidea y proliferación celular (NIS, tiroglobulina TG y KI-67) (Bertoni y col., 2015). De todas maneras cabe señalar que no siempre el aumento en la expresión génica da como resultado un aumento en las proteínas funcionales (Meikle y col., 2000; Sosa y col., 2009a). En mujeres, Sathi y col., (2013) reportaron que la terapia con progesterona aumentaba los niveles de T4L. En nuestro estudio, sólo un 70% de los propietarios de hembras enteras (n=144) que realizaron el cuestionario especificaron la fecha del último estro; por este motivo, no se incluyó esta variable en el análisis estadístico. Sin embargo, al estimarse la etapa de diestro de cada hembra, acorde a lo reportado por Hegstad-Davies y col. 2015, sólo un 9% de las hembras con fecha de último estro conocida estarían en diestro. En este mismo sentido, un estudio realizado en perros sanos (n= 693), reveló que la concentración de T4T y T4L fue mayor en hembras intactas que en machos y esta relación permaneció aún cuando se retiraron del análisis las hembras en etapa de diestro (Hegstad-Davies y col., 2015). Esto sugiere que existe una diferencia entre géneros más allá de la etapa del ciclo en la que se encuentren las hembras. Existe escasa información sobre la función tiroidea y los estrógenos en perros y si bien se ha reportado la presencia de receptores de estrógenos (ER α) en las células tiroideas caninas (Pessina y col., 2012), el papel que desempeña esta hormona sexual y sus receptores en la regulación

tiroidea se desconoce. En humanos se vió que los estrógenos aumentan las proteínas de transporte (TBG) (Surks y Sievert, 1995) aumentando la concentración de T4T (Arafah, 2001) y activando la transcripción de los genes encargados de iniciar la mitogénesis en los tirocitos (Manole y col., 2001). Asimismo los estrógenos aumentan la expresión del gen de insulina y su liberación (Alonso-Magdalena y col., 2008), mecanismo que podría explicar la mayor concentración de T4T registrada en las hembras, ya que la insulina promueve la secreción de TRH (McCarty, 1995). Esto concuerda con lo reportado previamente por Pessina y col. (2010), quienes encontraron mayores concentraciones séricas de insulina post ingesta en hembras que en machos y a su vez una correlación positiva entre la T4T y la insulina. En este mismo sentido, Morimoto y col. (2001), en un estudio realizado en ratas, reportaron variaciones en la concentración sérica y expresión génica de la insulina durante el ciclo estral y que estas diferencias se correlacionaban con los niveles circulantes de E2 y P4. No hemos encontrado información en caninos que permitan explicar los menores niveles de hormonas tiroideas encontrados en machos. Si bien el efecto de la testosterona sobre las hormonas tiroideas aún se desconoce en caninos, si se sabe que esta hormona produce un descenso en los niveles de TBG, pudiendo interferir en la concentración de T4T (Feldman y Nelson, 2007).

La talla no afectó las concentraciones séricas de T4T, T4L y TSH lo que se contrapone a lo reportado por Reimers y col. (1990) quienes encontraron mayores concentraciones de T4T en caninos de tallas pequeñas. No obstante en dicho trabajo se menciona como debilidad del mismo que los datos estaban demasiado desequilibrados para soportar este tipo de análisis, lo que podría haber desviado los resultados. A pesar de que el volumen de la glándula tiroidea varía con la talla en caninos (Castillo y col., 1997; Brömel y col., 2006), no hemos encontrado trabajos que vinculen el volumen glandular con la producción de hormonas tiroideas en caninos eutiroideos. Es posible que la variación en la concentración de estas hormonas no esté asociada a la talla de las distintas razas caninas sino a su origen genético común. Tradicionalmente en los estudios realizados en caninos, las razas han sido agrupadas sobre la base de sus fenotipos físicos como la talla, sin embargo otros estudios proponen una clasificación independiente basada en patrones de variación genética. Es así que razas caninas de tallas dispares se agrupan en "clusters" de origen genético común (Parker y col., 2004). En este mismo sentido, se reportó que razas caninas Europeas como el Beagle y el Sheltie presentaban capacidades tiroideas similares para acumular y liberar yodo radioactivo, siendo más bajas que las de la raza Basenji, de origen Africano (Nuñez y col., 1970).

Sin embargo, si las razas mencionadas se categorizaran de acuerdo a la talla, pertenecerían a la misma categoría (talla adulta de 11 y 12 kg respectivamente) y esas diferencias no se observarían.

Acorde a lo reportado en la bibliografía, la raza debería considerarse al analizar el estado tiroideo de los caninos clínicamente sanos (Gaughan y Bruyette, 2001; Lee y col., 2004; Shiel y col., 2007, Panakova y col., 2008; Hegstad-Davies y col., 2015). No obstante esta variable no pudo ser incluida como efecto fijo en nuestro estudio poblacional (n=270) y únicamente se la consideró como variable de efecto aleatorio, ya que las razas caninas no se encontraban igualmente representadas. Sin embargo si pudimos constatar la importancia de esta variable en el estudio piloto llevado a cabo en las razas Bulldog (inglés y francés). Estas razas emparentadas, actualmente de moda se enfrentan a muchas dificultades reproductivas (Wydooghe y col., 2013) y al ser el hipotiroidismo una de las posibles causas (Pancieria y col., 2012), su correcto diagnóstico despierta preocupación en los propietarios y criadores. Nuestro trabajo reportó un efecto de la raza sobre la concentración sérica de T4T y T4L, con niveles más altos de ambas hormonas en los Bulldog (inglés y francés) al compararlos con los grupos control (Ovejeros Alemanes y mestizos). Si bien los niveles hormonales estudiados se encontraron dentro de los intervalos de referencia internacional, estos hallazgos deben tenerse en cuenta al analizar el estado tiroideo de las razas Bulldog inglés y francés. No hemos encontrado trabajos similares en las razas Bulldog para contrastar nuestros resultados sin embargo se han observado diferencias para estas mismas hormonas en otras razas caninas. Hegstad-Davies y col. (2015) reportaron que las razas Samoyedo, Siberian Husky y Keeshond presentaban valores más altos de T4T y T4L que otras razas caninas. Por otro lado, los perros de raza Greyhounds, Sloughis, perros de trineo de Alaska, Scottish Deerhounds y Whippets revelaron concentraciones de T4T y/o T4L por debajo del rango de referencia establecido internacionalmente para la población canina general (Gaughan y Bruyette, 2001, Lee y col., 2004; Van Geffen y col., 2006; Shiel y col., 2007, Panakova y col., 2008; Sheerer y col., 2013). Con respecto a la variación de los niveles séricos de TSH con la raza, los hallazgos son contradictorios. Los resultados de nuestro estudio piloto, no mostraron efecto de la raza en los niveles séricos de TSH (Anexo I), estos hallazgos son concordantes con lo reportado por otros autores que tampoco encuentran diferencias raciales (Gaughan y Bruyette, 2001; Van Geffen y col., 2006; Shiel y col., 2007; Seavers y col., 2008; Panakova y col., 2008). En contraposición otros trabajos reportan una mayor concentración de TSH en la raza Collie, Samoyedo y Keeshond en comparación con los rangos de referencia generales caninos (Hegstad-Davies y col., 2015).

Aunque se desconocen los mecanismos por los cuales la raza afecta la concentración de hormonas tiroideas, es posible que procesos reguladores como la función y afinidad del receptor de la hormona contribuyan a esclarecer estas diferencias raciales (Hegstad-Davies y col., 2015). Es interesante observar que las razas Bulldog podrían presentar un cuadro de resistencia de los tejidos periféricos a las hormonas tiroideas, como se ha descrito en humanos a raíz de una alteración en el receptor de T3 (RT3 alfa y/o beta). A pesar de ser eutiroides, las personas que heredan esta resistencia periférica (herencia autosómica dominante) cursan con un incremento de T4 circulante (compensando la resistencia hormonal) y niveles de TSH normales o elevados (Brooks y col., 1981; Hopwood y col., 1986). Además, estos pacientes presentan una mayor incidencia de signos asociados al hipotiroidismo como bocio, infecciones frecuentes de oídos y anomalías cardíacas (Brucker-Davis y col., 1995). En el caso de las razas Bulldog (francés e inglés), la alta incidencia de enfermedades hereditarias (Sandøe y col., 2017), los niveles séricos de T4 elevados en estado eutiroides respecto a otras razas y el mayor riesgo de padecer signos dermatológicos y reproductivos (Wydooghe y col., 2013; Inoue y col., 2015) podrían sugerir una posible alteración en los receptores de hormonas tiroideas que contribuyan a explicar estas diferencias raciales. Por otro lado, los caninos de razas braquicéfalas (como los Bulldog) presentan glándulas tiroideas de mayor volumen en comparación a otras razas (Miller y col., 1965). Si bien no hemos encontrado estudios en esta especie que asocien el mayor volumen glandular con un aumento de actividad, en humanos se conoce que existe una correlación directa entre el volumen tiroideo y la concentración de T4L (Barrère y col., 2000).

Es sabido que la función tiroidea y el perfil lipídico se encuentran estrechamente relacionados, ya que las hormonas tiroideas estimulan la síntesis, movilización y degradación de los lípidos; siendo una herramienta que contribuye al diagnóstico de esta patología (Rogers y col., 1975; Bauer, 2004; Johnson, 2005; Feldman y Nelson, 2007). Nuestros estudios no mostraron diferencias en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos entre razas (Anexo I) y tampoco se vió asociado a ninguna de las variables consideradas en el estudio poblacional (edad, género y talla). Sin embargo la bibliografía no es concluyente al respecto. Hay trabajos que reportan mayores concentraciones de colesterol y triglicéridos en cachorros y neonatos en relación a otras categorías etarias (Wright y col., 2004; Wright-Rodgers y col., 2005; Pasquini y col., 2008). En relación al género, nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente por varios autores (Downs y col., 1993; Coppo y col., 2003; Osorio, 2006;

Osorio, 2008). Sin embargo, algunos trabajos reportan mayores concentraciones séricas de Col y TG en hembras que en machos (Kaspar y Norris, 1977; Pasquini y col., 2008; Pessina y col., 2009; 2010; 2014). Con respecto a la raza, Pasquini y col. (2008) sólo encontraron diferencias raciales en las concentraciones de Col, siendo más altas en los Rottweilers y los perros de montaña de los Pirineos. Las discrepancias encontradas entre nuestros resultados así como también en la bibliografía en general, pueden atribuirse a la consideración o no de determinados factores que pueden influir en el metabolismo de los lípidos (estilo de vida y dieta) así como también el método utilizado para el análisis de los metabolitos mencionados (Barrie y col., 1993; Downs y col., 1993; Pasquini y col., 2008)

Si bien cada laboratorio debería generar sus propios valores de referencia, no siempre es posible y se utilizan los que brinda el fabricante o aquellos reportados en la bibliografía internacional. En nuestro país, hasta el momento los laboratorios veterinarios no contaban con rangos de referencia propios para hormonas tiroideas ni para TSH en la especie canina. Este trabajo de tesis permitió que el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal (Facultad de Veterinaria) cuente con intervalos de referencia específicos (IRE) para cada una de las hormonas mencionadas.

De nuestro estudio se desprende que los límites inferiores de los IRE para T4T se encuentran por debajo del IRI utilizado por el laboratorio hasta la fecha (Tabla 5). Sin embargo los resultados obtenidos son similares con los reportados en estudios recientes con diseños experimentales semejantes al nuestro. Nunes (2017) incluyendo variables como género, raza y edad de los caninos reportó como límite inferior del IR para la T4T del perro de aguas portugués un valor de 0,8 µg/dL. En el mismo sentido, Hegstad-Davies y col., (2015) al utilizar 692 perros de distintas razas reportaron como límite inferior del IR para T4T un valor de 0.82 µg/dL.

Con respecto a la T4L, los resultados del límite inferior de los IRE en cachorros machos y hembras fueron los que más se alejaron del valor de referencia reportado para la población canina general en relación con las otras categorías (Tabla 5). Estos resultados son similares a los reportados para cachorros machos y hembras menores a un año por Ramírez y Osorio (2009) (1.07 ng/dL y 1.08 ng/dL respectivamente).

En lo referente a la TSH, los límites superiores de los IRE reportados en este estudio fueron menores al límite superior del IRI único utilizado actualmente en el laboratorio (Tabla 5). Resultados similares fueron reportados por Bhatti y col. (2006) en Beagles

sanos, donde los perros de 7 a 12 años presentaron mayores concentraciones de TSH (0.32 ng/mL), y los más jóvenes valores menores (0.13 ng/mL). Sin embargo Hegstad-Davies y col. (2015) y Nunes (2017) reportaron valores de límite superior para TSH por encima del IRI (0.58 ng/mL y 0.65 ng/mL respectivamente).

Las diferencias encontradas en los valores de corte para hormonas tiroideas y TSH podrían deberse a la variabilidad entre las poblaciones de referencia utilizadas y a la metodología empleada para la determinación de dichas hormonas. El método empleado para determinar el IRI único para cada hormona, obtenido de la bibliografía internacional es la técnica de Radioinmunoensayo (RIA) (T4T: 1.5 µg/dL (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005); T4L: 0.7ng/dL (Roover y col., 2006); TSH: 0.43 ng/mL (Scott-Moncrieff y col., 1998).

En nuestro estudio, las mediciones hormonales se realizaron por inmunoensayo quimioluminiscente. Se conoce que esta técnica tiene mayor precisión en el análisis de TSH canina en comparación con el RIA (Marca y col., 2001). En este mismo sentido, las concentraciones de T4T en caninos, determinadas por el método de inmunoensayo quimioluminiscente fueron 30-40% menores que las determinadas mediante la técnica de RIA (Singh y col., 1997).

La proporción de caninos confirmados utilizando intervalos de referencia específicos de género y/o edad (IRE) para las hormonas tiroideas y TSH difirió significativamente de la proporción obtenida a partir del IRI único para cada hormona. El uso de los IRE obtenidos en nuestro estudio podría contribuir a un diagnóstico más certero de los pacientes ingresados al LEMA con diagnóstico presuntivo de hipotiroidismo.

Al comparar la proporción de animales confirmados mediante los diferentes test diagnósticos en forma individual (T4T, T4L, TSH) o combinados (T4T y TSH) utilizando el IRI único, encontramos una mayor proporción de caninos confirmados para T4T que para T4L (Tabla 6). Si bien nuestros resultados no fueron contrastados con una prueba de oro, ya ha sido reportado que la T4T presenta una mayor sensibilidad y una menor especificidad diagnóstica que la T4L (Peterson y col., 1997; Scott-Moncrieff y col., 2012). Debido a su alta sensibilidad, la prueba de T4T posee una muy baja detección de falsos negativos, considerándose la prueba de detección inicial más popular para el hipotiroidismo canino. Para algunos autores, una concentración de T4T dentro del rango de referencia único es prueba suficiente para que el perro sea considerado eutiroideo (Scott-Moncrieff y Guptill-Yoran, 2005). Por el contrario, la disminución de la concentración de T4T no es considerada específica para el diagnóstico de esta

endocrinopatía, ya que puede darse en individuos eutiroideos, como consecuencia de una enfermedad no tiroidea o la administración de determinados fármacos. La T4L, al ser la fracción no unida a proteínas se encuentra menos afectada por estos factores (Scott-Moncrieff y col., 2012) considerándose una prueba más precisa de la actividad tiroidea que la T4T (Peterson y col., 1997). En nuestro estudio, al comparar las proporciones de caninos confirmados por T4T vs T4L utilizando los IRE, no se encontraron diferencias significativas.

La determinación de la sensibilidad de una prueba puede variar de acuerdo a la técnica de medición utilizada y a los intervalos de referencia empleados en el diagnóstico de la enfermedad (Braz Da Cruz y Manoel, 2014). En este trabajo se determinó la proporción de animales confirmados para cada prueba con la misma técnica de medición (quimioluminiscencia), por lo tanto la variación en la sensibilidad podría atribuirse a la modificación de los intervalos de referencia empleados en el diagnóstico de hipotiroidismo. Al aplicar los IRE para T4T podría disminuir su sensibilidad diagnóstica, aumentando el riesgo para un animal hipotiroideo de no ser diagnosticado (falsos negativos). Esto llevaría a reconsiderar el uso de la medición de T4T como prueba de screening en el diagnóstico de hipotiroidismo.

Por otra parte, al utilizar el IRI único para cada hormona, encontramos una mayor proporción (25% más) de caninos confirmados por T4T que por TSH; no encontrándose diferencias entre los confirmados por T4L vs TSH. En la bibliografía ha sido reportado que la limitante en la determinación de la TSH es la falta de sensibilidad del ensayo, ya que aproximadamente el 30% de los perros hipotiroideos tienen una concentración de TSH dentro del rango de referencia (Panciera, 1999; Kooistra y col., 2000; Scott-Moncrieff y col., 2012). Sin embargo al utilizar los IRE obtenidos en este estudio, la proporción de animales confirmados por TSH fue un 5% mayor que por T4T (Tabla 6). Hasta el momento la existencia de caninos clasificados como hipotiroideos con concentraciones de TSH dentro de los rangos de referencia se vinculan a las fluctuaciones de sus niveles séricos, a la supresión debida a fármacos o ENT, a las dificultades en detectar isoformas de TSH circulante y al descenso en la producción de TSH en el hipotiroideo crónico (Feldman y Nelson, 2007; Scott Moncrieff y col., 2012; Braz Da Cruz y Manoel, 2014). De este estudio se desprende que la diferencia en la sensibilidad diagnóstica entre T4T y TSH podría explicarse en parte por el uso en la actualidad de intervalos de referencia únicos que no tienen en cuenta variaciones por género y edad para los niveles séricos de estas hormonas.

Las proporción de caninos confirmados mediante la determinación de T4T y TSH de forma conjunta, fue menor que aquella obtenida mediante THS o T4T, ya sea utilizando el IRI o los IRE para cada hormona. Esto es concordante con lo reportado a nivel internacional, donde se observa un descenso en la sensibilidad diagnóstica y un aumento en la especificidad, aumentando la precisión diagnóstica al medir ambas hormonas (Peterson, 1997; Panciera, 1999; Feldman y Nelson, 2007; Scott-Moncrieff y col., 2012).

En cuanto a los datos obtenidos con respecto a la T4T, se encontró una mayor proporción de caninos machos y hembras adultos (jóvenes y mayores) confirmados por los IRI vs IRE. Es importante destacar la relevancia de estos resultados, ya que de no utilizar los IRE es posible que estemos considerando como hipotiroideos un 50% más de los animales remitidos como presuntivos para estas categorías (reportadas como de mayor riesgo para el hipotiroidismo canino primario) (Dixon y col., 1999; Castillo, 2011). Las consecuencias que puede acarrear el sobrediagnóstico se asocian a la implementación de tratamientos y monitoreos innecesarios en pacientes eutiroideos. Si bien la inducción de tirotoxicosis clínica en perros es difícil (Dixon, 2004), estaríamos retrasando el diagnóstico de la verdadera causa de enfermedad. En este mismo sentido, el tratamiento con levotiroxina a dosis de reposición en perros eutiroideos altera los valores de T4T, T4L y TSH, siendo el tiempo de espera luego de su interrupción de 1 a 4 semanas (Panciera y col., 1990; Ziglioli y col., 2017). Por otra parte, Panciera y col. (1990) sugieren que la administración de levotiroxina por largos períodos puede traer consecuencias más graves llegando a producir la atrofia de los tirotrofos hipofisarios y de la glándula tiroides en caninos.

Por otro lado, no se encontraron diferencias entre la proporción de cachorros machos y hembras diagnosticados por el IRI vs IRE para T4T. Esto podría deberse a que, como fue detallado en los resultados del objetivo 2, los cachorros son los que presentan mayores concentraciones de T4T, con valores de corte más cercanos al IRI único, utilizado indistintamente para todas las categorías etarias (IRE hembras: 1.32 µg/dL; IRE machos: 1.17 µg/dL vs IRI 1.5 µg/dL).

En este trabajo se encontró que la frecuencia de animales hipotiroideos confirmados por T4T utilizando el IRI estuvo influenciada por el género, existiendo una mayor cantidad de machos adultos confirmados que de hembras. Esto se contrapone a lo reportado por la bibliografía en donde se observa cierta predisposición en las hembras (Pedersen y col., 1999; Sundburg y col., 2016) o que ambos sexos están igualmente representados (Mooney, 2011). Al confirmar los animales mediante los IRE,

encontramos un descenso en el número de casos confirmados para ambos géneros. Sin embargo, el descenso en la proporción de confirmados fue mayor en machos, y ya no se encontraron diferencias entre las proporciones de machos y hembras confirmados. Estos hallazgos sugieren que el diagnóstico endócrino de hipotiroidismo canino con T4T debe considerar el género del animal.

En relación a la T4L, no se encontraron diferencias entre las proporciones de hembras y machos adultos al comparar los confirmados por IRI vs IRE; ya que los valores de T4L para las edades adultas fueron similares entre sí y similares al IRI único utilizado hasta el momento. La diferencia entre la proporción de cachorros confirmados por IRI vs IRE no pudo analizarse debido al pequeño tamaño de la muestra. No obstante, siendo que esta categoría presentó los valores de IRE más alejados del IRI único, se esperaría encontrar diferencias.

En cuanto a la TSH, la proporción de perros diagnosticados hipotiroideos mediante los IRE fue mayor para todas las categorías etarias al compararla con la obtenida por el IRI. De estos resultados se desprende que el uso de los IRE podría evitar el subdiagnóstico de caninos hipotiroideos en la fase más temprana de la enfermedad “Hipotiroidismo subclínico” (Dixon y col., 1999; Castillo, 2011). Poder diagnosticar el paciente en esta fase temprana previene el deterioro de la glándula y la consecuente progresión hacia el hipotiroidismo clínico, evitando así un compromiso metabólico mayor (Ayala, 1997). Además, se conoce que la estimulación con niveles elevados de TSH por tiempos prolongados - perros hipotiroideos no diagnosticados- puede ser un factor predisponente a la aparición del carcinoma tiroideo (Roger y Dumont, 1987; Deleu y col., 1999). Esto debe tenerse en cuenta ya que el hipotiroidismo es una endocrinopatía con un pronóstico excelente si se diagnostica precozmente y se instaura el tratamiento correcto.

9. CONCLUSIONES

En caninos clínicamente sanos, los niveles séricos de T4T y T4L son mayores en hembras que en machos; ambas hormonas disminuyen con la edad, presentando mayores niveles séricos en cachorros que en perros adultos de 1 a 5 años y de 5 a 10 años. La concentración sérica de TSH aumenta con la edad, siendo menor en cachorros que en perros adultos de 5 a 10 años.

Los perros de razas Bulldog francés e inglés poseen concentraciones séricas de T4T, T4L, TSH, colesterol y triglicéridos dentro de los rangos de referencia internacional para la población canina; sin embargo estas razas presentan mayores niveles séricos de T4T y T4L que los grupos control.

El uso de intervalos de referencia específicos de género y edad permite una aproximación diagnóstica más certera en el diagnóstico de hipotiroidismo canino. El uso de los IRE evidenció un descenso del 50% en la proporción de caninos adultos confirmados mediante la determinación de T4T; cuestionando el uso de este test en forma aislada en el diagnóstico de hipotiroidismo canino.

El uso de IRE en el diagnóstico de hipotiroidismo mediante la determinación de TSH produce un aumento del 9% en la proporción de caninos adultos confirmados. Este aumento en la sensibilidad diagnóstica podría explicar en parte la existencia de perros hipotiroideos con valores normales de TSH al utilizar un intervalo de referencia único.

La proporción de caninos confirmados mediante la determinación conjunta de T4T y TSH es menor que la obtenida para cada hormona por separado. Este descenso en la sensibilidad ha sido reportado a nivel internacional y es adjudicado a un aumento de la precisión diagnóstica al medir ambas hormonas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Carrera, M. P., Cederroth, C. R., Baquie, M., Gauthier, B. R., Nef, S., Stefani, E., Nadal, A. (2008). Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER α . *PloS one*, 3(4), e2069.
- Arafah, B. M. (2001). Increased need for thyroxine in women with hypothyroidism during estrogen therapy. *New England Journal of Medicine*, 344(23), 1743-1749.
- Ayala, A. R., & Wartofsky, L. (1997). Minimally symptomatic (subclinical) hypothyroidism. *The Endocrinologist*, 7(1), 44-50.
- Barone, R., Simoens, P. (2010). *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Neurologie. Système nerveux périphérique, glandes endocrines, esthésiologie*. Paris, Francia: Vigot.
- Barrère, X., Valeix, P., Preziosi, P., Bensimon, M., Pelletier, B., Galan, P., & Hercberg, S. (2000). Determinants of thyroid volume in healthy French adults participating in the SU. VI. MAX cohort. *Clinical Endocrinology*, 52(3), 273-278.
- Barrie, J., Watson, T.D.G., Stear, M.J., & Nash, A.S. (1993). Plasma cholesterol and lipoprotein concentrations in the dog: the effects of age, breed, gender and endocrine disease. *The Journal of Small Animal Practice*, 34:507–512.

- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), doi:10.18637/jss.u067.i01.
- Bauer, J. E. (2004). Lipoprotein-mediated transfer of dietary and synthesized lipids and lipid abnormalities of dogs and cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 224, 668–675.
- Bertoni, A. P. S., Brum, I. S., Hillebrand, A. C., & Furlanetto, T. W. (2015). Progesterone upregulates gene expression in normal human thyroid follicular cells. *International Journal of Endocrinology*, Doi: 10.1155/2015/864852.
- Bhatti, S. F., Duchateau, L., Van Ham, L. M., De Vliegher, S. P., Mol, J. A., Rijnberk, A. D., & Kooistra, H. S. (2006). Effects of growth hormone secretagogues on the release of adenohipophyseal hormones in young and old healthy dogs. *The Veterinary Journal*, 172(3), 515-525.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., & White, J. S. S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(3), 127-135.
- Braz Da Cruz, F. G. & Manoel, F.M. (2014) Hipotireoidismo Canino. En M. Marques Jerico, J.P. Neto, M.M. Kogika. *Tratado de Medicina Interna de caes e gatos*. (V.2 pp. 1665-1675) Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Brömel, C., Pollard, R. E., Kass, P. H., Samii, V. F., Davidson, A. P., & Nelson, R. W. (2006). Comparison of ultrasonographic characteristics of the thyroid gland in healthy small-, medium-, and large-breed dogs. *American journal of Veterinary Research*, 67(1), 70-77.

- Brooks, M. H., Barbato, A. L., Collins, S., Garbincius, J., Neidballa, R. G., & Hoffman, D. (1981). Familial thyroid hormone resistance. *The American Journal of Medicine*, 71(3), 414-421.
- Brucker-Davis, F., Skarulis, M. C., Grace, M. B., Benichou, J., Hauser, P., Wiggs, E., & Weintraub, B. D. (1995). Genetic and clinical features of 42 kindreds with resistance to thyroid hormone: The National Institutes of Health Prospective Study. *Annals of Internal Medicine*, 123(8), 572-583.
- Castillo, V. (2011): Canine hypothyroidism. *Revista Veterinaria Focus*, 21(1), 2-8.
- Castillo, V. (2017). Hipotiroidismo. En V. Castillo. *Principales endocrinopatías de los ejes adrenal y tiroideo en perros y gatos. (pp. 83-94)* 1° ed. Buenos Aires, Argentina: Servet.
- Castillo, V., Marquez, A., Rodríguez, M., & Lalia, J. (1997). Parámetros bioquímico-endocrinos de utilidad en la etapa del crecimiento y desarrollo del Ovejero Alemán, Doberman y Gran Danés. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 29(1), 105-111.
- Chait, A., Bierman, E. L., & Albers, J. J. (1979). Regulatory role of triiodothyronine in the degradation of low density lipoprotein by cultured human skin fibroblasts. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 48(5), 887-889.
- Chastain, C.B. & Panciera, D.L. (1995). Hypothyroid diseases. En S.J. Ettinger & E. C. Feldman, *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (V.2, pp. 1487-1501). 4° ed. Philadelphia.

- Coppo, N. D., Coppo, J. A., & Lazarte, M. A. (2003). Intervalos de confianza para colesterol ligado a lipoproteínas de alta y baja densidad en suero de bovinos, equinos, porcinos y caninos. *Revista Veterinaria*, 14(1), 3-10.
- Daminet S., & Ferguson D.C. (2003). Influence of drugs on thyroid function in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17:463–72.
- de Adana Pérez, R. R. (2009). Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test. *Jano: Medicina y humanidades*, (1736), 30.
- De La Cruz Palomino, L.F. (1995). Tiroides. En: A. García Sacristán & L.F. De la Cruz Palomino. *Fisiología Veterinaria*. (pp. 707-718). Madrid, España: Interamericana.
- Deleu, S., Pirson, I., Coulonval, K., Drouin, A., Taton, M., Clermont, F., ... Maenhaut, C. (1999). IGF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 149(1–2), 41–51.
- Delignette-Muller, M. L., & Dutang, C. (2015). fitdistrplus: An R package for fitting distributions. *Journal of Statistical Software*, 64(4), 1-34.
- Dixon, R. M., Reid, S. W. J., & Mooney, C. T. (2002). Treatment and therapeutic monitoring of canine hypothyroidism. *Journal of Small Animal Practice*, 43(8), 334-340.
- Dixon, R.M. (2004). Canine hypothyroidism. En C.T., Mooney & M.E., Peterson (Eds), *BSAVA manual of Canine and Feline Endocrinology* (pp. 76-94). 3ª ed. Gloucester, Inglaterra: BSAVA.

- Dixon, R.M., Reid, S.W. & Mooney, C.T. (1999). Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Veterinary Record* 145, 481–487.
- Downs, L. G., Bolton, C. H., Crispin, S. M., & Wills, J. M. (1993). Plasma lipoprotein lipids in five different breeds of dogs. *Research in Veterinary Science*, 54(1), 63-67.
- Duncan Basset JH, Harvey CB, Williams GR. (2003) Mechanism of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 213: 1-11.
- Ehrenkranz, J., D, P. R. B. P., D, G. L. S. P., Schneider, A., Lee, J. L., Ilstrup, S., ... Benvenega, S. (2015). Version 4.3 May 2, 2015.
- Elliott, D.A., King, L.G. & Zerbe, C.A. (1995). Thyroid Hormone Concentrations In Critically Ill Canine Intensive Care Patients. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 5 (1), 17–23.
- Evans, H. E., & De Lahunta, A. (2013). *Miller's anatomy of the dog*. St. Lois, Elsevier.
- Feldman, E.C. & Nelson, R.W. (2007). Hipotiroidismo. En *Endocrinología y Reproducción canina y felina*. (pp. 98-170). 3ª ed. Buenos Aires, Argentina: Inter-medica.
- Ferguson, D. C. (1994). Update on diagnosis of canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 24(3), 515-539.

Ferguson, D. C. (1998). The dog as a model of thyroid physiology. In Proc 16th Am Coll Vet Intern Med Forum (pp. 565-567).

Ferguson, D. C., & Hoenig, M. (1997). Re-examination of dosage regimens for L-thyroxine (T4) in the dog: Bioavailability and persistence of TSH suppression. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11, 121.

Fialkovičová, M., Mardzinová, S., Benková, M., Mojžišová, J., Gaálová, M., & Sesztáková, E. (2012). Seasonal influence on the thyroid gland in healthy dogs of various breeds in different weights. *Acta Veterinaria Brno*, 81(2), 183-188.

Finnegan, D. (2014). *referenceIntervals: Reference Intervals*. R package version 1.1.1.

Foley, C., Bracker, K. & Drellich, S. (2009). Hypothalamic-pituitary axis deficiency following traumatic brain injury in a dog: Case Report. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19(3), 269–274.

Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladvits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F., & Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 441-453.

Fyffe J.C., Kampschmidt, K., Dang V., Poteet, B.A., He, Q., Lorie, C... Fetro, V.M. (2003) Congenital hypothyroidism with goiter in Toy Fox Terriers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17:50.

- Gaskill, C. L., Burton, S. A., Gelens, H. C., Ihle, S. L., Miller, J. B., Shaw, D. H., ... & Cribb, A. E. (1999). Effects of phenobarbital treatment on serum thyroxine and thyroid-stimulating hormone concentrations in epileptic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 215(4), 489-496.
- Gaughan, K. R., & Bruyette, D. S. (2001). Thyroid function testing in Greyhounds. *American Journal of Veterinary Research*, 62(7), 1130-1133.
- González, E., & Quadri, S. K. (1988). Effects of aging on the pituitary-thyroid axis in the dog. *Experimental Gerontology*, 23(3), 151-160.
- González, F., & Serrano, C. (2017). Incidencia de enfermedades endocrinas en caninos entre los años 2013-2016 en un hospital veterinario universitario de Chile. *Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes*, 10 (3), 90-94.
- González-Segrado, M., & Martín-Gil, F. J. (2004). Population-specific reference values for thyroid hormones on the Abbott ARCHITECT i2000 analyzer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42(5), 540-542.
- Gookin, J. L., Trepanier, L. A., & Bunch, S. E. (1999). Clinical hypothyroidism associated with trimethoprim-sulfadiazine administration in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214(7), 1028-31.
- Graham, P. A., Refsal, K. R., & Nachreiner, R. F. (2007). Etiopathologic findings of canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(4), 617-631.

Harris, E. K., & Boyd, J. C. (1990). On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clinical Chemistry*, 36(2), 265-270.

Harrison, X. A., Donaldson, L., Correa-Cano, M. E., Evans, J., Fisher, D. N., Goodwin, C. E., ... & Inger, R. (2018). A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ*, 6, e4794.

Hawthorne, A. J., Booles, D., Nugent, P. A., Gettinby, G., & Wilkinson, J. (2004). Body-weight changes during growth in puppies of different breeds. *Journal of Nutrition*, 134(8), 2027S-2030S.

Hegstad-Davies, R. L., Torres, S. M. F., Sharkey, L. C., Gresch, S. C., Munoz-Zanzi, C. A., & Davies, P. R. (2015). Breed-specific reference intervals for assessing thyroid function in seven dog breeds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), 716–727.

Hoh, W.P. & Oh, T. H. (2006). Circadian variations of serum thyroxine, free thyroxine and 3, 5, 3'triiodothyronine concentrations in healthy dogs. *Journal of Veterinary Science*, 7 (1), 25–29.

Hollowell J. G., Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, B. LE. (2002). Serum TSH, T4, and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(2), 489–499.

Hopwood, N. J., Sauder, S. E., Shapiro, B., & Sisson, J. C. (1986). Familial partial peripheral and pituitary resistance to thyroid hormone: a frequently missed diagnosis?. *Pediatrics*, 78(6), 1114-1122.

Hubert, B., La Farge, F. D., Braun, J. P., & Magnol, J. P. (1987). Hypertriglyceridemia in two related dogs. *Companion animal practice (USA)*.

Hubl, W., Schmieder, J., Gladrow, E., & Demant, T. (2002). Reference intervals for thyroid hormones on the architect analyser. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(2), 165–166.

Inoue, M., Hasegawa, A., Hosoi, Y., & Sugiura, K. (2015). Breed, gender and age pattern of diagnosis for veterinary care in insured dogs in Japan during fiscal year 2010. *Preventive Veterinary Medicine*, 119(1-2), 54-60.

Johnson, M. C. (2005). Hyperlipidemia disorders in dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 27, 361-370.

Kantrowitz, L. B., Peterson, M. E., Trepanier, L. A., Melian, C., & Nichols, R. (1999). Serum total thyroxine, total triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations in epileptic dogs treated with anticonvulsants. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214, 1804-1808.

Kaspar, L. V., & Norris, W. P. (1977). Serum chemistry values of normal dogs (Beagles): association with age, sex, and family line. *Laboratory Animal Science*, 27(6):980-985.

Kemppainen, R. J., & Behrend, E. N. (2001). Diagnosis of canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31(5), 951-962.

- Kooistra, H. S., Diaz-Espineira, M., Mol, J. A., Van Den Brom, W. E., & Rijnberk, A. (2000). Secretion pattern of thyroid-stimulating hormone in dogs during euthyroidism and hypothyroidism. *Domestic Animal Endocrinology*, 18(1), 19-29.
- Kratzsch, J., Fiedler, G. M., Leichtle, A., Brügel, M., Buchbinder, S., Otto, L., ... Thiery, J. (2005). New reference intervals for thyrotropin and thyroid hormones based on national academy of clinical biochemistry criteria and regular ultrasonography of the thyroid. *Clinical Chemistry*, 51(8), 1480–1486.
- Krzyżewska-Młodawska, A., Max, A., & Bartyzel, B. J. (2014). Influence of gonadectomy on serum T4L concentrations in male and female dogs. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Serie Veterinary Medicine*, 17(01). Recuperado de: <http://www.ejpau.media.pl/volume17/issue1/art-01.html>
- Lee, J. A., Hinchcliff, K. W., Piercy, R. J., Schmidt, K. E., & Nelson Jr, S. (2004). Effects of racing and nontraining on plasma thyroid hormone concentrations in sled dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(2), 226-231.
- Manole, D., Schildknecht, B., Gosnell, B., Adams, E., & Derwahl, M. (2001). Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms, 86(3), 1072-1077.
- Marca M.C., Loste A., Sanz M.C., Saez T., Verde M.T., Ramos J. J. (1996). Hipotiroidismo canino: Revisión y actualización de su diagnóstico. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales* 16: 111-117.

- Marca, M. C., Loste, A., Orden, I., Gonzalez, J. M., & Marsella, J. A. (2001). Evaluation of canine serum thyrotropin (TSH) concentration: comparison of three analytical procedures. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(2), 106-110.
- Martin-Almendra, M.A. (2016). Exploration of morphology and thyroid function. *Revista ORL*, 78(Supl. 2), 17-35.
- McCarty, M. F. (1995). Central insulin may up-regulate thyroid activity by suppressing neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus. *Medical Hypotheses*, 45(2), 193-199.
- Meikle, A., Bielli, A., Masironi, B., Pedrana, G., Wang, H., Forsberg, M., Sahlin, L. (2000). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reproduction, Nutrition, Development* 40 (6), 587–596.
- Miller, M. E., Christensen, G. C., & Evans, H. E. (1965). Anatomy of the Dog. *Academic Medicine*, 40(4), 400.
- Milne K. L., Hayes H. M. Jr., (1981). Epidemiologic features of canine hypothyroidism. *Cornell Veterinarian*, 71, 3–14.
- Mooney, C. T. (2011). Canine hypothyroidism: a review of aetiology and diagnosis. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(3), 105-114.
- Mooney, C. T. (2017). Canine Hypothyroidism. En S.J., Ettinger & C.F., Feldman (Eds). *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and cat*. 8^a ed. Missouri: Saunders Elsevier.

- Mooney, C. T., & Shield, R. E. (2012). Canine Hypothyroidism. En C.T., Mooney & M.E., Peterson (Eds), *BSAVA manual of Canine and Feline Endocrinology* (pp. 63- 85). 4ª ed. Gloucester, Inglaterra: BSAVA.
- Morimoto, S., & Cerbón, M. A., Alvarez-Alvarez, A., Romero-Navarro, G., & D az-Sánchez, V. (2001). Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. *Life Sciences*, 68(26), 2979-2985.
- Mosallanejad, B., Ghadiri, A. R., Avizeh, R., Pourmahdi, M., & Rajabalipour, M. (2014). Serum concentrations of lipids and lipoproteins and their correlations with thyroid hormones in clinically healthy German shepherd dogs: Effects of season, gender and age. *The Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 6(2), 53-61.
- Nachreiner, R. F., Refsal, K. R., Ravis, W. R., Hauptman, J., Rosser, E.J. & Pedersoli, W. M. (1993). Pharmacokinetics of L-thyroxine after its oral administration in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 54 (12), 2091–8.
- Nelson, R. W. & Couto, G. C. (2014). Disorders of the thyroid gland. En R.W. Nelson & G. C. Couto (Eds), *Small Animal Internal Medicine* (pp 740-776). 5ª ed. Missouri: Elsevier.
- Nunes, M. A. B. (2017). *Determinação do intervalo fisiológico de T4 e TSH no Cão de Água Português* (Tesis doctoral). Universidad de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal.
- Nuñez, E. A., Becker, D. V., Furth, E. D., Belshaw, B. E., & Scott, J. P. (1970). Breed differences and similarities in thyroid function in purebred dogs. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 218(5), 1337-1341.

- Osorio, J. H., & Suárez, Y. J. (2016). Comparison of thyroid hormone levels by sex in adult dogs. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP)*, 27(1), 59-63.
- Osorio, J. H. (2006). Total cholesterol and HDL-cholesterol in aging dogs. *Biosalud*; 5:19-24.
- Osorio, J. H. (2008). The variability in the canine lipid profile values and its possible relationship with the measurement method used. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 3(1)70-77.
- Panakova, L., Koch, H., Kolb, S., & Mueller, R. S. (2008). Thyroid testing in Sloughis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(5), 1144-1148.
- Panciera, D. L. (1999). Is it possible to diagnose canine hypothyroidism?. *Journal of Small Animal Practice*, 40(4), 152-157.
- Panciera, D. L., Hinchcliff, K. W., Olson, J., & Constable, P. D. (2003). Plasma thyroid hormone concentrations in dogs competing in a long-distance sled dog race. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(4), 593-596.
- Panciera D.L., MacEwen E.G., Atkins C.E., Bosu, W.T., Refsal, K.R. & Nachreiner, R.F. (1990) Thyroid function tests in euthyroid dogs treated with L-thyroxine. *American Journal of Veterinary Research*, 51:22–26.
- Panciera D.L. (2001) Conditions associated with canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31:935–50.

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

Pancier, D. L., Peterson, M. E., & Birchard, S. J. (2000). En R.V. Morgan. *Diseases of the thyroid gland. Handbook of small animal practice* (pp 507-522).

Pancier, D. L., Purswell, B. J., Kolster, K. A., Werre, S. R., & Trout, S. W., (2012). Reproductive effects of prolonged experimentally induced hypothyroidism in bitches. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(2), 326-333.

Paradis, M., Page, N., Lariviere, N., & Fontaine, M. (1996). Serum-free thyroxine concentrations, measured by chemiluminescence assay before and after thyrotropin administration in healthy dogs, hypothyroid dogs, and euthyroid dogs with dermatopathies. *The Canadian Veterinary Journal*, 37(5), 289.

Parker, H. G., Kim, L. V., Sutter, N. B., Carlson, S., Lorentzen, T. D., Malek, T. B., ... & Kruglyak, L. (2004). Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*, 304(5674), 1160-1164.

Pasquini, A., Luchetti, E., & Cardini, G. (2008). Plasma lipoprotein concentrations in the dog: the effects of gender, age, breed and diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(6), 718-722.

Patkar, R. P., Dalvi, S. H., & Kumarasamy, J. (2014). Serum thyroid hormone levels during growth period in labrador dog. *Indian Journal of Field Veterinarians*, 9(4), 1-3.

Pedersen, N. C. (1999). A review of immunologic diseases of the dog. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69(2-4), 251-342.

- Pessina, P., Barcia, M., Jericó, M., & Castillo, V. (2014). Variaciones fisiológicas, en el Ovejero Alemán, de los parámetros metabólicos y endocrinos más frecuentemente utilizados en el diagnóstico de hipotiroidismo canino. *Veterinaria*, 50(193), 76-84.
- Pessina, P., Castillo, V., Araújo, M., Carriquiry, M., & Meikle, A. (2012). Expression of thyroid-specific transcription factors in thyroid carcinoma, contralateral thyroid lobe and healthy thyroid gland in dogs. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 108-113.
- Pessina, P., Castillo, V., Sartore, I., Borrego, J., & Meikle, A. (2010a). Semiquantitative immunohistochemical marker staining and localization in canine thyroid carcinoma and normal thyroid gland. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14:102-112.
- Pessina, P., Sosa, C., Araújo, M., Orellana, B., Brambillasca, S., Cajarville, C., & Meikle, A. (2010b). Perfiles metabólicos y endócrinos en perros sanos: influencia de la ingesta y el sexo. *Veterinaria*, 46(177-180), 33-38.
- Peterson, M. E., Melian, C., & Nichols, R. (1997). Measurement of serum total thyroxine, triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations for diagnosis of hypothyroidism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211(11), 1396-1402.
- Pettigrew R., Fyfe, J.C., Gregory, B.L., Lipsitz, D., Delahunta, A. Summers, B.A. & Shelton, G.D. (2007). CNS hypomyelination in rat terrier dogs with congenital goiter and a mutation in the thyroid peroxidase gene. *Veterinary Pathology*, 44:50-56.

- Piechotta, M., Arndt, M., & Hoppen, H. O. (2010). Autoantibodies against thyroid hormones and their influence on thyroxine determination with chemiluminescence immunoassay in dogs. *Journal of Veterinary Science*, 11(3), 191-196.
- Ramírez, G. F., & Osorio, J. H. (2009). Niveles séricos de Tetrayodotironina Libre (T4 L), mediante el Método de Electroquimioluminiscencia en caninos. *Revista Científica*, 19(3), 238-241.
- Reese, S., Breyer, U., Deeg, C., Kraft, W. & Kaspers, B. (2005). Thyroid sonography as an effective tool to discriminate between euthyroid sick and hypothyroid dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19 (4), 491–498.
- Reimers, T. J., Lawler, D. F., Sutaria, P. M., Correa, M. T., & Erb, H. N. (1990). Effects of age, sex, and body size on serum concentrations of thyroid and adrenocortical hormones in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 51(3), 454-457.
- Reimers, T. J., Mummery, L. K., McCann, J. P., Cowan, R. G., & Concannon, P. W. (1984). Effects of reproductive state on concentrations of thyroxine, 3, 5, 3'-triiodothyronine and cortisol in serum of dogs. *Biology of Reproduction*, 31(1), 148-154.
- Reusch, C. E., Gerber, B. & Boretti, F.S. (2002). Serum fructosamine concentrations in dogs with hypothyroidism. *Veterinary Research Communications*, 26 (7), 531–6.
- Roger, P. P., & Dumont, J. E. (1987). Thyrotropin is a potent growth factor for normal human thyroid cells in primary culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 149(2), 707-711.

- Rogers, W. A., Donovan, E. F., & Kociba, G. J. (1975). Lipids and lipoproteins in normal dogs and in dogs with secondary hyperlipoproteinemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 166(11), 1092-1100.
- Roover, K. D., Duchateau, L., Carmichael, N., Van Geffen, C., & Daminet, S. (2006). Effect of storage of reconstituted recombinant human thyroid-stimulating hormone (rhTSH) on thyroid-stimulating hormone (TSH) response testing in euthyroid dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), 812-817.
- Sandøe, P., Kondrup, S. V., Bennett, P. C., Forkman, B., Meyer, I., Proschowsky, H. F., ... & Lund, T. B. (2017). Why do people buy dogs with potential welfare problems related to extreme conformation and inherited disease? A representative study of Danish owners of four small dog breeds. *PLoS One*, 12(2), e0172091.
- Sathi, P., Kalyan, S., Hitchcock, C. L., Pudek, M., & Prior, J. C. (2013). Progesterone therapy increases free thyroxine levels—data from a randomized placebo-controlled 12-week hot flush trial. *Clinical Endocrinology*, 79(2), 282-287.
- Scarlett, J. M. (1994). Epidemiology of thyroid diseases of dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 24(3), 477-486.
- Scott-Moncrieff, C., & Guptill-Yoran, L. (2005) Hypothyroidism. En S.J. Ettinger & E.C. Feldman. *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (1535-1544). 6^a ed. Elsevier Saunders.
- Scott-Moncrieff, J. C. (2012). Thyroid disorders in the geriatric veterinary patient. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42(4), 707-725.

- Scott-Moncrieff, J. C., Nelson, R. W., Bruner, J. M., & Williams, D. A. (1998). Comparison of serum concentrations of thyroid-stimulating hormone in healthy dogs, hypothyroid dogs, and euthyroid dogs with concurrent disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212(3), 387-391.
- Scott-Moncrieff, J.C. (2010). Hypothyroidism. En S.J., Ettinger & C.F., Feldman (Eds). *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (pp. 1751-1761). 7^a ed. Missouri: Saunders Elsevier.
- Seavers, A., Snow, D. H., Mason, K. V., & Malik, R. (2008). Evaluation of the thyroid status of Basenji dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 86(11), 429–434.
- Sheerer, K. N., Couto, C. G., Marin, L. M., Zaldívar-Lopez, S., Iazbik, M. C., Dillberger, J. E., ... Denicola, D. B. (2013). Haematological and biochemical values in North American Scottish deerhounds. *Journal of Small Animal Practice*, 54(7), 354–360.
- Shiel, R. E., Brennan, S. F., Omodo-Eluk, A. J., & Mooney, C. T. (2007). Thyroid hormone concentrations in young, healthy, pretraining greyhounds. *Veterinary Record*, 161(18), 616-619.
- Shiel, R. E., Sist, M., Nachreiner, R. F., Ehrlich, C. P., & Mooney, C. T. (2010). Assessment of criteria used by veterinary practitioners to diagnose hypothyroidism in sighthounds and investigation of serum thyroid hormone concentrations in healthy Salukis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(3), 302-308.

- Singh, A. K., Jiang, Y., White, T., & Spassova, D. (1997). Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples obtained from dogs, cats, and horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(3), 261-268.
- Sosa, C., Carriquiry, M., Fernandez, A., Talmon, M., Abecia, J.A., Forcada, F., & Meikle, A., (2009). Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reproduction, Fertility, and Development* 21, 1–13.
- Sriphrapadang, C., Pavarangkoon, S., Jongjaroenprasert, W., Chailurkit, L. O., Ongphiphadhanakul, B., & Aekplakorn, W. (2014). Reference ranges of serum TSH, FT4 and thyroid autoantibodies in the Thai population: The national health examination survey. *Clinical Endocrinology*, 80(5), 751–756.
- Studer, H., Forster, R., Conti, A., Kohler, H., Haerberli, A., & Engler, H. (1978). Transformation of normal follicles into thyrotropin-refractory “cold” follicles in the aging mouse thyroid gland. *Endocrinology*, 102(5), 1576-1586.
- Sullivan, P., Gompf, R., Schmeitzel, L., Clift, R., Cottrell, M., & McDonald, T. P. (1993). Altered platelet indices in dogs with hypothyroidism and cats with hyperthyroidism. *American Journal of Veterinary Research*, 54(12), 2004-2009.
- Sundburg, C. R., Belanger, J. M., Bannasch, D. L., Famula, T. R., & Oberbauer, A. M. (2016). Gonadectomy effects on the risk of immune disorders in the dog: a retrospective study. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 278.
- Surks, M. I., & Sievert, R. (1995). Drugs and thyroid function. *New England Journal of Medicine*, 333(25), 1688-1694.

- Taeymans, O., Peremans, K. & Saunders, J. H. (2007). Thyroid imaging in the dog: current status and future directions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (4), 673–684.
- Van Geffen, C., Bavegems, V., Duchateau, L., De Roover, K., & Daminet, S. (2006). Serum thyroid hormone concentrations and thyroglobulin autoantibodies in trained and non-trained healthy whippets. *Veterinary Journal*, 172(1), 135–140.
- Vi oiu, I. G., Crivineanu, V., & Goran, G. V. (2013). Study on relations of serum TSH, triiodothyronine and thyroxine levels and age in canine population from Muscle area. *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, 46(4), 180-185.
- Wada, M., Minamisono, T., Ehrhart, L. A., Naito, H. K., & Mise, J. (1977). Familial hyperlipoproteinemia in beagles. *Life sciences*, 20(6), 999-1008.
- Wright, A. S., Bauer, J. E., Bigley, K. E., Lees, G. E., & Waldron, M. K. (2004). Maternal dietary fatty acids modify canine puppy plasma lipoprotein distributions during the suckling period. *The Journal of Nutrition*, 134(8), 2106S-2109S.
- Wright-Rodgers, A. S., Waldron, M. K., Bigley, K. E., Lees, G. E., & Bauer, J. E. (2005). Dietary fatty acids alter plasma lipids and lipoprotein distributions in dogs during gestation, lactation, and the perinatal period. *The Journal of Nutrition*, 135(9), 2230-2235.
- Wydooghe, E., Berghmans, E., Rijsselaere, T., & Van Soom, A. (2013). International breeder inquiry into the reproduction of the English bulldog. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 82(1), 38-43.

Zeileis, A., & Hothorn, T. (2002). *Diagnostic checking in regression relationships*. Recuperado de: <https://cran.r-project.org/web/packages/lmtest/vignettes/lmtest-intro.pdf>

Ziglioli, V., Panciera, D. L., Troy, G. C., Monroe, W. E., Boes, K. M., & Refsal, K. R. (2017). Effects of levothyroxine administration and withdrawal on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in euthyroid dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(3), 705-710.

11. ANEXO I

Veterinarski Arhiv 88 (5), 709-721, 2018

DOI: 10.24099/vet.arhiv.0129

Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed

Matilde Canedo-Pérez^{1*}, Danilo Fila², Erika Castroman³, and Paula Pessina¹

¹Laboratory of Endocrinology and Animal Metabolism, Veterinary Faculty, University of La República, Montevideo, Uruguay

²Department of Reproduction, Theriogenology, Veterinary Faculty, University of La República, Montevideo, Uruguay

³Department of Veterinary Hospital Center, Semiological Clinic, Veterinary Faculty, University of La República, Montevideo, Uruguay

Canedo-Pérez, M., D. Fila, E. Castroman, P. Pessina: Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed. Vet. arhiv 88, 709-721, 2018.

ABSTRACT

This study investigates whether breed or gender affect serum hormone and metabolite concentrations used to evaluate thyroid function in the Bulldog breed. Sixty-seven healthy adult English Bulldogs (n = 20), French Bulldogs (n = 17), German Shepherds (n = 15) and mongrels (n = 15) of both sexes were selected. Determination of serum total thyroxine (TT4), free thyroxine (FT4), and thyroid stimulating hormone (TSH) was performed via a competitive enzymatic chemiluminescent solid-phase immunoassay. Cholesterol and triglyceride concentrations were analyzed by spectrophotometry. Serum concentrations of TT4, FT4, TSH, cholesterol, and triglycerides for French and English Bulldogs were within the international reference ranges for the canine population. Breed had a significant effect on serum levels of TT4 (P = 0.0012) and FT4 (P < 0.0001); English and French Bulldogs had higher serum TT4 and FT4 concentrations than German Shepherds and mongrels. Gender had a significant effect only on serum FT4 levels; females exhibited higher levels (P = 0.0309). Cholesterol, triglycerides, and TSH serum concentrations did not differ with breed or gender. Healthy French and English Bulldogs included in this study had higher serum concentrations of TT4 and FT4 compared with German Shepherds and mongrels, and the concentration of FT4 was also higher in females.

Key words: bulldog; thyroid hormones; canine; hypothyroidism; cholesterol; triglycerides

*Corresponding author:

M. Canedo-Pérez, DVM, Laboratory of Endocrinology and Animal Metabolism, Veterinary Faculty, University of La República, Lasplaces 1550, Montevideo, Uruguay, E-mail: matildecanedodvm@gmail.com

ISSN 0372-5480

Printed in Croatia

Introduction

French and English Bulldogs are breeds that have experienced a rapid increase in popularity (SANDØE et al., 2017). They were the third and sixth most popular dog breeds in America in 2016, respectively (ANONYM., 2016). However, the appealing extreme physical features of these breeds are linked to a number of health problems that make these dogs the most expensive in terms of veterinary care (SANDØE et al., 2017). Even though their many reproductive difficulties are mostly attributed to anatomical and physiological breed peculiarities (WYDOOGHE et al., 2013), the correct diagnosis of these reproductive abnormalities is still a challenge in veterinary practice. Although endocrinology studies in canines associating the hypothyroid state to possible detrimental effects on reproduction are limited, and results have been conflicting (JOHNSTON, 1991; SEGALINI et al., 2009; PANCIERA et al., 2012); hypothyroidism is still taken into account in clinical practice for diagnoses in cases where fertility is affected (DIXON, 2004). Furthermore, hypothyroidism has detrimental effects on reproduction in women (KRASSAS et al., 2010), and studies that fail to prove this association in canines have suggested that further investigation is necessary to determine whether fertility is affected by thyroid hormone deficiency (PANCIERA et al., 2012).

It has been reported that the Bulldog breed represents one of the most at-risk breeds for dermatological disorders (INOUE et al., 2015). More than 60% of hypothyroid dogs have combined dermatological and metabolic pathologies (DIXON et al., 1999). Although it is known that these pure breeds were refined using inbreeding, and that they have high levels of inherited diseases (SANDØE et al., 2017), we found only one report regarding hypothyroidism for the Bulldog breed. MAJOR et al. (2015) reported a case of congenital hypothyroidism with goiter in a juvenile French Bulldog, caused by a thyroid peroxidase (TPO) gene mutation.

Although hypothyroidism is the most frequent endocrinopathy in dogs (FERGUSON, 1994), its definitive diagnosis remains a challenge for veterinary clinicians due to its myriad clinical presentations (CHASTAIN and PANCIERA, 1995). Furthermore, numerous factors, such as breed and gender, may act in tandem to affect blood biochemistry in general and endocrine parameters in particular (DIXON, 2004). Thyroid hormone concentrations may differ significantly among breeds (GAUGHAN and BRUYETTE, 2001; PANAKOVA et al., 2008; SHIEL et al., 2010; HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). As a result of these breed differences, the thyroid function of healthy dogs can be misdiagnosed (HEGSTAD-DAVIES et al., 2015).

Hyperlipidemia is a common feature of many endocrinopathies, such as hypothyroidism. Therefore, a lipid profile is a relevant tool for diagnosing this pathology (JOHNSON, 2005; FELDMAN and NELSON, 2007). Synthesis, mobilization, and degradation of lipids are stimulated by thyroid hormones (DIXON, 2004). Hypothyroidism,

M. Canedo-Pérez et al.: Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed

therefore, decreases the lipid metabolism, which translates into hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia (PANCIERA, 1994) in 88% and 78% of dogs with hypothyroidism, respectively (DIXON et al., 1999). As for thyroid hormones, factors such as gender and breed can affect lipid metabolism in canines (PASQUINI et al., 2008; SHEERER et al., 2013).

To the best of our knowledge, there have been no reports in the literature of Bulldog (French and English) variations in hormones and metabolites used for diagnosing hypothyroidism in these breeds. If these variations are present, they have not been considered when establishing international cut-off values for the hormones used in the diagnosis of canine hypothyroidism (DIXON and MOONEY, 1999). It is possible that hypothyroidism could be, primarily in its early stages, a misdiagnosed pathology (subclinical hypothyroidism) (CASTILLO, 2011) perpetuating the signs of thyroid hormone deficiency over time (PANCIERA et al., 2012). The aim of this study was to contribute to the knowledge of the endocrine-metabolic thyroid status in healthy Bulldogs (French and English), and determine whether there were differences in the concentrations of serum hormones used for the diagnosis of canine hypothyroidism (TT4, FT4, and TSH). We also sought to study cholesterol and triglyceride levels as a function of breed and gender.

Materials and methods

The experimental design of our study was approved by the Honorary Commission of Animal Experimentation of the University of the Republic, Uruguay. The sample population comprised 67 clinically healthy, privately owned dogs that ranged in age from 1-9 years. Twenty of these animals were English Bulldogs of both sexes (9 males and 11 females, all intact), and 17 were French Bulldogs of both sexes (6 males and 11 females, all intact). Two sub-populations of adult dogs were used as a control group: German Shepherds (7 males and 8 females, all intact) and mongrel canines (8 males and 7 females, all intact). The inclusion criteria included the absence of any clinical signs at the time of blood collection and no history of disease or use of drugs that could affect serum levels of thyroid hormones, TSH, cholesterol or triglycerides 3 months prior to participation. Pregnant or lactating females were not included. Blood samples were collected at private veterinary clinics, after a fast of at least eight hours, by venipuncture from the cephalic vein in tubes with no anticoagulant that were properly labeled and centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The obtained sera were preserved at -20 °C until further analysis.

Hormone and biochemical analyses were performed at the Laboratory of Endocrinology and Animal Metabolism, Faculty of Veterinary Medicine, University of the Republic of Uruguay. Serum concentrations of TT4, FT4, and TSH were determined using a solid-phase competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (IMMULITE

1000) and commercial test kits (Siemens, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA). The sensitivity of the TT4 assay was 1.54 nmol/L; the intra-assay coefficients of variation for the first canine thyroid commercial control (11.58 nmol/dL) and second canine thyroid commercial control (23.17 nmol/L) (Siemens, Diagnostic Product Corporation) were 2.4% and 5.9%, respectively. The inter-assay coefficients of variation were 6.4% and 3.5%, respectively. The sensitivity of the FT4 assay was 1.67 pmol/L; the intra-assay coefficients for the first commercial control (14.16 pmol/L) and second commercial control (34.75 pmol/L) (Lypochek Immunoassay Plus Control Kit, Bio-Rad, CA, USA) were 2.5% and 3.7%, respectively. The interassay coefficients were 4.7% and 7.6%, respectively. The sensitivity of the TSH assay was 2.83 mIU/L; the intra-assay coefficients of variation for the first canine thyroid commercial control (14.36 mIU/L) and second canine thyroid commercial control (112.61 mIU/L) were 2.1% and 1.7%, respectively. The inter-assay coefficients were 2.9% and 4.7%, respectively (Siemens, Diagnostic Product Corporation).

The intracoefficients of variation for the cholesterol commercial controls I (3.55 mmol/L) and II (6.13 mmol/L) (Biosystems, Barcelona, Spain; Biochemistry Control Serum I and II) were 2.2% and 1.6%, respectively. The inter-assay coefficients were 3.0% and 3.4%, respectively. The intracoefficients of variation for the triglyceride commercial controls I (0.65 mmol/L) and II (2.32 mmol/L) (Biosystems, Biochemistry Control Serum I and II), were 2.5% and 1.7%, respectively. The inter-assay coefficients were 4.0% and 3.6%, respectively.

Total cholesterol, triglycerides, TT4, FT4, and TSH concentrations were analyzed using a mixed procedure (PROC MIXED Statistical Analysis System, SAS). We included breed, gender, and their interactions as fixed effects in the model. The age variable was included as a covariate in the model. A natural log-transformation was applied to the TSH and triglycerides concentrations to obtain a normal distribution for the analyses. The data were then back-transformed in order to present the results. P values less than 0.05 were considered to be statistically significant, and P values between 0.05 and 0.10 were considered to indicate a trend.

Results

The effects of breed and gender on the concentrations of the different hormones and metabolites determined in this study are summarized in Tables 1 and 2, respectively. Serum levels of the variables studied in these breeds were within the international reference ranges for the general canine population (DIXON and MOONEY, 1999).

Mean serum concentrations of TT4 and FT4 varied significantly among breeds ($P = 0.0012$ and $P = 0.0001$, respectively). English and French Bulldog breeds did not differ in concentrations of serum TT4 and FT4. While English Bulldogs had higher serum TT4 concentrations compared with German Shepherds ($P = 0.0003$) and mongrels ($P = 0.0016$), French Bulldogs only presented higher concentrations of TT4 than German Shepherds ($P = 0.0469$; Fig. 1A). English Bulldogs had significantly higher serum FT4 concentrations than German Shepherds ($P = 0.0001$) and mongrels ($P = 0.0039$).

M. Canedo-Pérez et al.: Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed

Likewise, French Bulldogs had significantly higher serum FT4 concentrations than German Shepherds ($P = 0.001$) and mongrels ($P = 0.0431$; Fig. 1B). Among the control groups, no differences were found in the serum concentrations of TT4 and FT4. The mean serum concentration of TT4 did not differ as a function of gender. However, the FT4 concentration was significantly higher in females than in males ($P = 0.0309$; Fig. 2).

Table 1. Serum concentrations of TT4, FT4, TSH, cholesterol and triglycerides in clinically healthy dogs of different breed groups with their significance levels (P values)

Variable	English Bulldog	French Bulldog	German Shepherd	mongrel	P
TT4 (nmol/L)	32.69 ± 1.67	28.70 ± 1.93	23.30 ± 1.80	24.45 ± 1.80	0.0012**
FT4 (pmol/L)	19.44 ± 0.64	18.53 ± 0.77	14.67 ± 0.77	16.22 ± 0.77	<0.0001**
TSH (mIU/L)	8.89 ± 0.75	8.22 ± 1.86	10.19 ± 1.86	8.89 ± 1.86	0.6240
CHOL (mmol/L)	5.28 ± 0.25	5.20 ± 0.29	5.04 ± 0.32	5.96 ± 0.29	0.1441
TG (mmol/L)	0.87 ± 0.10	0.91 ± 0.11	0.77 ± 0.12	0.67 ± 0.11	0.4327

Values are expressed as means ± standard deviation (SD). TT4: total thyroxine; FT4: free thyroxine; TSH: thyroid stimulating hormone; CHOL: cholesterol; TG: triglycerides. ** $P < 0.01$.

Table 2. Serum concentrations of TT4, FT4, TSH, cholesterol and triglycerides in clinically healthy dogs ($n = 67$) of different genders with their significance levels (P values)

Variable	Female	Male	P
TT4 (nmol/L)	27.93 ± 1.16	26.64 ± 1.29	0.4703
FT4 (pmol/L)	18.02 ± 0.51	16.35 ± 0.51	0.0309*
TSH (mIU/L)	8.89 ± 0.75	9.55 ± 0.75	0.8455
CHOL (mmol/L)	5.64 ± 0.19	5.10 ± 0.22	0.0701
TG (mmol/L)	0.81 ± 0.07	0.79 ± 0.08	0.8642

Values are expressed as means ± standard deviation (SD). TT4: total thyroxine; FT4: free thyroxine; TSH: thyroid stimulating hormone; CHOL: cholesterol; TG: triglycerides. * $P < 0.05$.

Regarding serum TSH concentrations, no significant differences were found as a function of breed or gender.

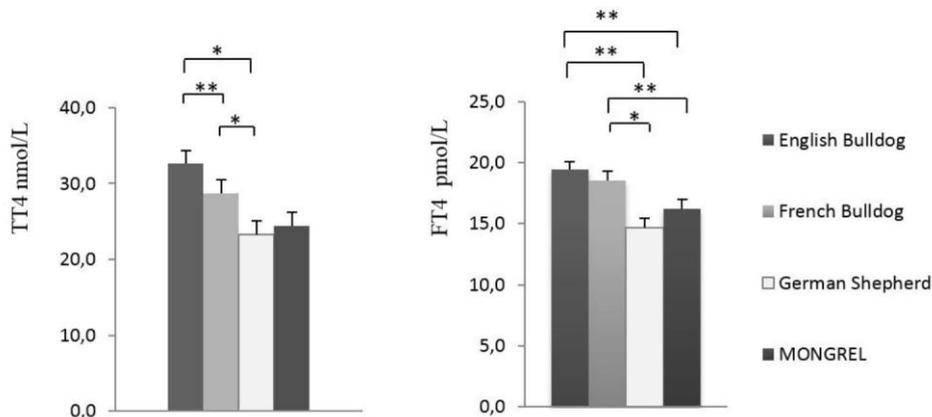


Fig. 1A: Serum Total Thyroxine (TT4) (nmol/L) concentration according to breed. 1B: Serum Free Thyroxine (FT4) (pmol/L) concentration according to breed. $P<0.05$. The asterisks indicate differences in the same graph. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

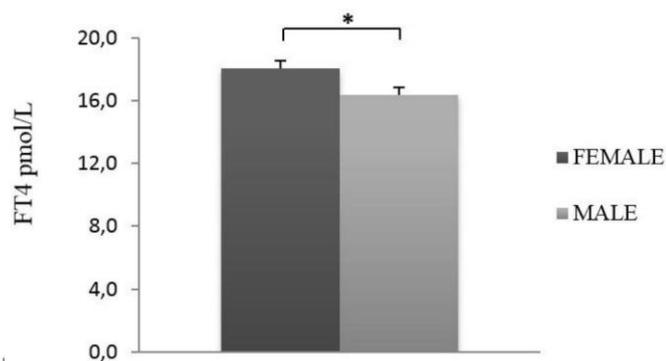


Fig. 2. Serum Free Thyroxine (FT4) (pmol/L) concentration according to gender. The asterisks indicate differences within the same graph. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

No differences were found between breeds or genders in terms of serum cholesterol or triglycerides concentrations. We accordingly concluded that there are no significant interactions between breed or gender and the concentrations of the hormones and metabolites we studied.

Discussion

Like most purebred dogs, Bulldogs undergo purposeful breeding; any effect on reproduction has considerable clinical importance. Since it has been reported that hypothyroidism causes reversible reproductive abnormalities in dogs (PANCIERA et al., 2012) and these breeds face many reproductive difficulties (WYDOOGHE et al., 2013), a correct diagnosis of hypothyroidism is essential. Furthermore, levels of metabolites and hormones used for the diagnosis of hypothyroidism may vary due to factors such as breed (SHIEL et al., 2007; PANAKOVA et al., 2008; HEGSTAD-DAVIES et al., 2015) and gender (REIMERS et al., 1984; SHIEL et al., 2010; HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). As a result, reliable reference values with which to compare the results of an individual test are needed. Even so, we did not find previous research that examined the effects of breed and gender on the serum concentrations of these hormones in healthy French and English Bulldogs.

We observed an effect of breed on the serum concentrations of TT4 and FT4: higher levels of both hormones were noted in English and French Bulldogs. Although we did not find other studies that contradicted our results, previous canine studies have reported a strong effect of breed on serum concentrations. Consistent with our results, HEGSTAD-DAVIES et al. (2015) found that mean TT4 and FT4 values differed significantly among breeds; Samoyed, Siberian Husky, and Keeshond breeds exhibited the highest mean values. On the other hand, Greyhounds, Sloughis, Alaskan sled dogs, and Scottish Deerhounds exhibited TT4 and FT4 serum concentrations below the internationally established reference range for the canine population (GAUGHAN and BRUYETTE, 2001; LEE et al., 2004; SHIEL et al., 2007; PANAKOVA et al., 2008). Scottish Deerhounds were only measured for TT4 (SHEERER et al., 2013). In contrast, VAN GEFFEN et al. (2006) observed significant variations only in serum TT4 levels of healthy Whippets, which were lower than those of control groups of different breeds. Although the mechanisms for breed-specific differences in these hormones are not known, it is possible that regulatory processes, such as thyroid hormone receptor function and affinity, may contribute to breed differences (HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). In Beagles euthyroid lean dogs had lower TT4 values than obese dogs (DAMINET et al., 2003). Moreover, Greyhounds, a lean breed, have TT4 and FT4 serum concentrations below the internationally established reference range for the canine population (GAUGHAN and BRUYETTE, 2001). These data are concordant with our results: Bulldogs, an overweight breed (CORBEE, 2013), had higher TT4 and FT4 serum concentrations than the control groups. In the evolution of other species, a compensatory equilibrium has been reported in which high circulating hormone concentrations compensate for decreased hormone tissue sensitivity (*i.e.*, low receptor concentration) (CHROUSOS et al., 1982; YOUNG et al., 1995). Therefore, it can be proposed that the higher thyroid hormone levels in healthy Bulldogs could be a compensatory response to hypothyroid tissues, resulting in naturally occurring excess weight.

M. Canedo-Pérez et al.: Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed

compensatory response to hypothyroid tissues, resulting in naturally occurring excess weight.

There are some contradictory findings regarding serum TSH levels. Some authors did not report breed differences (GAUGHAN and BRUYETTE, 2001; VAN GEFFEN et al., 2006; SHIEL et al., 2007; SEAVERS et al., 2008), and others found a higher concentration of TSH in Collies, Samoyeds and Keeshonds compared with the general canine reference ranges (HEGSTAD-DAVIES et al., 2015). However, there was no potential feedback effect of high TSH euthyroid levels on TT4 or FT4 concentrations, as it has been reported for the Sloughi breed (PANAKOVA et al., 2008).

We noted that breed did not have an effect on serum cholesterol or triglyceride concentrations, as has been previously reported (BARRIE et al., 1993; DOWNS et al., 1993; SEAVERS et al., 2008). In addition, USUI et al. (2015), in a recent study that included French Bulldogs and other dog breeds, found no breed association between triglyceride concentrations. The highest cholesterol concentrations were found in Miniature Schnauzers, a canine breed already known for its innate hyperlipidemia (WHITNEY et al., 1993). Our results are consistent with those of USUI et al. (2015): higher lipid concentrations are relatively uncommon in healthy canines and are typically associated with specific breeds.

We found that serum FT4 concentrations were higher in female dogs than male dogs. However, serum concentrations of TT4 and TSH did not differ between the sexes. These findings are consistent with those reported by HEGSTAD-DAVIES et al. (2015). These authors found higher levels of serum TT4 and FT4 concentrations - but not TSH - in females. Similar results have been observed in the Saluki breed - females had higher TT4 and FT4 levels than males (SHIEL et al., 2010). In contrast, other authors did not find gender differences (BENAVIDES and OSORIO, 2009; PATKAR et al., 2014; MOSALLANEJAD et al., 2015; OSORIO and SUÁREZ, 2016). However, these studies did not include possible sources of variations in thyroid hormone concentrations, such as breed and age.

No differences were found between either cholesterol or triglyceride concentrations and gender, as was reported previously (DOWNS et al., 1993; COPPO et al., 2003; OSORIO, 2006; OSORIO, 2009). However, several studies have shown that serum cholesterol and triglyceride concentrations were significantly higher in females than in males (PASQUINI et al., 2008; PESSINA et al., 2009; 2010; 2014). These discrepancies may be attributable to different factors influencing lipid metabolism, such as lifestyle and diet (DOWNS et al., 1993; PASQUINI et al., 2008) as well as the method of analysis of the respective studies (OSORIO, 2009).

In conclusion, concentrations of TT4 and FT4 were higher in French and English Bulldog breeds. Only serum FT4 levels varied with gender (*i.e.*, higher in females).

M. Canedo-Pérez et al.: Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed

Although the serum levels of all the variables studied were within the wide international reference ranges for the general canine population, these findings should be taken into account when analyzing thyroid status in the breeds noted above.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Ana Meikle for the helpful support and critical reading of the manuscript and the technical assistance of Isabel Sartore and Claudia Menezes.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/ or publication of this article.

References

- AnonymOus (2016): Breed registration statistics. https://www.thekennelclub.org.uk/media/1098176/top_20_breeds_2015_-_2016.pdf.
- BARRIE, J., T. D. G. WATSON, M. J. STEAR, A. S. NASH (1993): Plasma cholesterol and lipoprotein concentrations in the dog: The effects of age, breed, gender and endocrine disease. *J. Small. Anim. Pract.* 34, 507-512.
DOI: 10.1111/j.1748-5827.1993.tb03523.x
- Benavides, G. F. R., J. H. Osorio (2009): Free Tetraiodothyronine (FT4) serum levels by electrochemiluminiscence method in canines. *Rev. Cientif. FCV-LUZ* 19, 238-241 (in Spanish).
- Castillo, V. (2011): Canine hypothyroidism. *Rev. Vet. Focus* 21, 2-8 (in Spanish).
DOI: 10.1055/s-0034-1381838
- Chastain, C. B., D. L. Panciera (1995): Hypothyroid disease. In: *Textbook of veterinary internal medicine*. (Ettinger, S. J., E. C. Feldman, Eds.), 4^a ed. Philadelphia, Saunders, pp. 1847-1501.
- CHROUSOS, G. P., D. RENQUIST, D. BRANDON, C. EIL, M. PUGEAT, R VIGERSKY, M. B. LIPSETT (1982): Glucocorticoid hormone resistance during primate evolution: receptor-mediated mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 2036-2040.
DOI: 10.1073/pnas.79.6.2036
- Coppo, N. B., J. A. Coppo, M. A. Lazarte (2003): Confidence intervals for high and low density lipoprotein cholesterol in bovine, equine, porcine and canine serum. *Rev. Vet.* 14, 3-10 (in Spanish).
- Corbee, R. J. (2013): Obesity in show dogs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 904-910.
- DAMINET, S., I. JEUSETTE, L. DUCHATEAU, M. DIEZ, I. VAN DE MAELE, A. DE RICK (2003): Evaluation of thyroid function in obese dogs and in dogs undergoing a weight loss protocol. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50, 213-218.
DOI: 10.1046/j.1439-0442.2003.00534.x

M. Canedo-Pérez et al.: Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed

- DIXON, R. M. (2004): Canine hypothyroidism. In: BSAVA endocrinology. (Mooney, C. T., M. E. Peterson, Eds.), 3rd Publications, pp. 76-94. manual of canine and feline ed. Gloucester, UK, BSAVA
- DIXON, R. M., C. T. MOONEY (1999): Evaluation of serum free thyroxine and thyrotropin concentrations in the diagnosis of canine hypothyroidism. *J. Small. Anim. Pract.* 40, 72-78.
DOI: 10.1111/j.1748-5827.1999.tb03040.x
- DIXON, R. M., S. W. Reid, C. T. Mooney (1999): Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Vet. Rec.* 145, 481-487.
DOI: 10.1136/vr.145.17.481
- DOWNS, L. G., C. H. BOLTON, S. M. CRISPIN, J. M. WILLS (1993): Plasma lipoprotein lipids in five different breeds of dogs. *Res. Vet. Sci.* 54, 63-67.
DOI: 10.1016/0034-5288(93)90012-5
- FELDMAN, E. C., R. W. Nelson (2007): Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd ed., Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina, pp. 98-170 (in Spanish).
- FERGUSON, D. C. (1994): Update on the diagnosis of canine hypothyroidism. *Vet. Clin. North Am.* 24, 515-540.
DOI: 10.1016/S0195-5616(94)50057-3
- GAUGHAN, K. R., D. S. BRUYETTE (2001): Thyroid function testing in Greyhounds. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1130-1133.
DOI: 10.2460/ajvr.2001.62.1130
- HEGSTAD-DAVIES, R. L., S. M. F. TORRES, L. C. SHARKEY, S. C. GRESCH, C. A. MUNOZ-ZANZI, P. R. DAVIES (2015): Breed-specific reference intervals for assessing thyroid function in seven dog breeds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27, 716-727.
DOI: 10.1177/1040638715606953
- INOUE, M., A. HASEGAWA, Y. HOSOI, K. SUGIURA (2015): Breed, gender and age pattern of diagnosis for veterinary care in insured dogs in Japan during fiscal year 2010. *Prev. Vet. Med.* 119, 54-60.
DOI: 10.1016/j.prevetmed.2015.02.010
- Johnson, M. C. (2005): Hyperlipidemia disorders in dogs. *Compendium* 27, 361- 370.
- JOHNSTON, S. D. (1991): Clinical approach to infertility in bitches with primary anestrus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 21, 421-425.
DOI: 10.1016/S0195-5616(91)50051-6
- KRASSAS G. E., K. POPPE, D. GLINOER (2010): Thyroid function and human reproductive health. *Endocrine Rev.* 31, 702-755.
DOI: 10.1210/er.2009-0041
- LEE, J. A., K. W. HINCHCLIFF, R. J. PIERCY, K. E. SCHMIDT, Jr. S. NELSON (2004): Effects of racing and nontraining on plasma thyroid hormone concentrations in sled dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224, 226-231.
DOI: 10.2460/javma.2004.224.226

M. Canedo-Pérez et al.: Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed

- MAJOR, S., R. W. PETTIGREW, J. C. FYFE (2015): Molecular genetic characterization of thyroid dysmorphogenesis in a french bulldog. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 1534-1540.
DOI: 10.1111/jvim.13651
- Mosallanejad, B., A. R. Ghadiri, R. Avizeh, M. Pourmahdi, M. Rajabalipour (2015): Serum concentrations of lipids and lipoproteins and their correlations with thyroid hormones in clinically healthy German shepherd dogs: Effects of season, sex and age. *I. J. V. S. T.* 6, 53-61.
- Osorio, J. H. (2006): Total cholesterol and HDL-cholesterol in aging dogs. *Biosalud* 5, 19-24.
- Osorio, J. H. (2009): The variability in the canine lipid profile values and its possible relationship with the measurement method used. *Vet. Zootec.* 3, 70-77.
- Osorio, J. H., Y. J. Suárez (2016): Comparison of thyroid hormone levels by sex in adult canines. *Rev. investig. vet. Perú* 27, 59-63 (in Spanish).
DOI: 10.15381/rivep.v27i1.11444
- PANAKOVA, L., H. KOCH, S. KOLB, R. S. MUELLER (2008): Thyroid testing in Sloughis. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 1144-1148.
DOI: 10.1111/j.1939-1676.2008.0155.x
- Pancierera, D. L. (1994): Hypothyroidism in dogs: 66 cases (1987-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 761-767.
- PANCIERA, D. L., B. J. PURSWELL, K. A. KOLSTER, S. R. WERRE, S. W. TROUT (2012): Reproductive effects of prolonged experimentally induced hypothyroidism in bitches. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 326-333.
DOI: 10.1111/j.1939-1676.2011.00872.x
- PASQUINI, A., E. LUCHETTI, G. CARDINI (2008): Plasma lipoprotein concentrations in the dog: the effects of gender, age, breed and diet. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92, 718-722.
DOI: 10.1111/j.1439-0396.2007.00771.x
- Patkar, R. P., S. H. Dalvi, J. Kumarasamy (2014): Serum thyroid hormone levels during growth period in labrador dog. *I. J. F. V.* 9, 1-3.
- PESSINA, P., A. FERNÁNDEZ-FOREN, E. CUETO, L. DELUCCHI, V. CASTILLO, A. MEIKLE (2009): Cortisol secretion after adrenocorticotrophin (ACTH) and Dexamethasone tests in healthy female and male dogs. *Acta. Vet. Scand.* 51, 33.
DOI: 10.1186/1751-0147-51-33
- Pessina, P., C. Sosa, M. Araújo, B. Orellana, S. Brambillasca, C. Cajarville, A. Meikle (2010): Metabolic and endocrine profiles in healthy dogs: influence of ingestion and sex. *Veterinaria (Montevideo)* 46, 33-38 (in Spanish).
- Pessina, P., M. Barcia, M. Jericó, V. Castillo (2014): Physiological variations, in the German Shepherd, of the metabolic and endocrine parameters most frequently used in the diagnosis of canine hypothyroidism. *Veterinaria (Montevideo)* 50, 76-84 (in Spanish).

M. Canedo-Pérez et al.: Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed

- REIMERS, T. J., L. K. MUMMERY, J. P. McCANN, R. G. COWAN, P. W. CONCANNON (1984): Effects of reproductive state on concentrations of thyroxine, 3, 5, 3'-triiodothyronine and cortisol in serum of dogs. *Biol. Reprod.* 31, 148-154.
DOI: 10.1095/biolreprod31.1.148
- SANDØE, P., S. V. KONDRUP, P. C. BENNETT, B. FORKMAN, I. MEYER, H. F. PROSCHOWSKY, T. B. LUND (2017): Why do people buy dogs with potential welfare problems related to extreme conformation and inherited disease? A representative study of Danish owners of four small dog breeds. *PloS One* 12, e0172091.
DOI: 10.1371/journal.pone.0172091
- SEAVERS, A., D. H. SNOW, K. V. MASON, R. MALIK (2008): Evaluation of the thyroid status of Basenji dogs in Australia. *Aust. Vet. J.* 86(11), 429-434.
DOI: 10.1111/j.1751-0813.2008.00357.x
- SEGALINI, V., T. HERICHER, A. GRELLET, D. ROSENBERG, F. GARNIER, A. FONTBONNE (2009): Thyroid function and infertility in the dog: a survey in five breeds. *Reprod. Domest. Anim.* 44(s2), 211-213.
DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01445.x
- SHEERER, K. N., C. G. COUTO, L. M. MARIN, S. ZALDÍVAR-LOPEZ, M. C. IAZBIK, J. E. DILLBERGER, D. B. DENICOLA (2013): Haematological and biochemical values in North American Scottish deerhounds. *J. Small. Anim. Pract.* 54, 354-360.
DOI: 10.1111/jsap.12086
- SHIEL, R. E., S. F. BRENNAN, A. J. OMODO-ELUK, C. T. MOONEY (2007): Thyroid hormone concentrations in young, healthy, pretraining greyhounds. *Vet. Rec.* 161(18), 616-619.
DOI: 10.1136/vr.161.18.616
- SHIEL, R. E., M. SIST, R. F. NACHREINER, C. P. EHRLICH, C. T. MOONEY (2010): Assessment of criteria used by veterinary practitioners to diagnose hypothyroidism in sighthounds and investigation of serum thyroid hormone concentrations in healthy Salukis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 236, 302-308.
DOI: 10.2460/javma.236.3.302
- USUI, S., H. YASUDA, Y. KOKETSU (2015): Lipoprotein cholesterol and triglyceride concentrations associated with dog body condition score; effect of recommended fasting duration on sample concentrations in Japanese private clinics. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 1063-1069.
DOI: 10.1292/jvms.15-0032
- VAN GEFFEN, C., V. BAVEGEMS, L. DUCHATEAU, K. DE ROOVER, S. DAMINET (2006): Serum thyroid hormone concentrations and thyroglobulin autoantibodies in trained and non-trained healthy whippets. *Vet. J.* 172, 135-140.
DOI: 10.1016/j.tvjl.2005.03.007

M. Canedo-Pérez et al.: Characterization of the endocrine-metabolic profile used to evaluate thyroid function in dogs of the English and French Bulldog breed

WHITNEY, M. S., G. D. BOON, A. H. REBAR, J. A. STORY, G. D. BOTTOMS (1993): Ultracentrifugal and electrophoretic characteristics of the plasma lipoproteins of Miniature Schnauzer dogs with idiopathic hyperlipoproteinemia. *J. Vet. Intern. Med.* 7, 253-260.

DOI: 10.1111/j.1939-1676.1993.tb01016.x

Wydooghe, E., E. Berghmans, T. Rijsselaere, A. Van Soom (2013): International breeder inquiry into the reproduction of the English bulldog. *Vlaams Diergen. Tijds.* 82, 38-43.

YOUNG, L. J., P. K. NAG, D. CREWS (1995): Species differences in behavioral and neural sensitivity to estrogen in whiptail lizards: correlation with hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Neuroendocrinol.* 61, 680-686.

DOI: 10.1159/000126895

Received: 21 October 2017

Accepted: 14 June 2018

Canedo-Pérez, M., D. Fila, E. Castroman, P. Pessina: Karakterizacija endokrino-metaboličkog profila koji se koristi za procjenu funkcije štitnjače kod pasa pasmina engleski i francuski buldog. *Vet. arhiv* 88, 709-721, 2018.

Sažetak

Ovim radom istraženo je utječu li pasmina i spol na koncentracije hormona i metabolita u serumu koji služi za procjenu funkcije štitnjače u pasa pasmine buldog. Uključeno je ukupno šezdeset i sedam odraslih zdravih pasa oba spola, među kojima je bilo 20 engleskih buldoga, 17 francuskih buldoga, 15 njemačkih ovčara i 15 križanaca. Ukupni tiroksin (TT4), slobodni tiroksin (FT4) i hormon koji stimulira štitnjaču (TSH) određeni su pomoću kompetitivne enzimske kemiluminoscentne imunoanalize. Koncentracije kolesterola i triglicerida analizirane su spektrofotometrijom. Koncentracije TT4, FT4, TSH, kolesterola i triglicerida u serumu za francuske i engleske buldoga bile su unutar međunarodnih referentnih raspona za populaciju pasa. Pasma je imala signifikantan učinak na razinu TT4 ($p = 0,0012$) i FT4 ($p < 0,0001$) u serumu, pri čemu su engleski i francuski buldozi imali veće koncentracije TT4 i FT4 u serumu nego njemački ovčari i križanci. Spol je imao signifikantan utjecaj samo na razinu FT4 u serumu, pri čemu je ta razina bila viša kod ženki ($p = 0,0309$). Kolesterol, trigliceridi i koncentracije TSH seruma nisu se razlikovali ovisno o pasmini ili spolu. Zdravi francuski i engleski buldozi uključeni u ovo istraživanje su, u usporedbi s njemačkim ovčarima i križancima, imali veće koncentracije TT4 i FT4 u serumu. Također, koncentracija FT4 u serumu bila je viša kod ženki.

Ključne riječi: buldog; hormoni štitnjače; pas; hipotireoza; kolesterol; trigliceridi

12. ANEXO II

Cuestionario

Este cuestionario es realizado para el uso académico exclusivo de la tesis de Maestría en salud animal de la Dra. Matilde Canedo, a desarrollarse en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Datos generales del propietario:

Nombre y Apellido:

Teléfono:

Datos del canino:

Nombre:

Veterinaria y número de socio:

Raza:

Sexo:

Fecha de nacimiento:

Peso:

Estado corporal:

Castrado/Intacto

Fecha de último celo (si corresponde)

Fecha de castración (si corresponde)

Historia de Gestación (si corresponde)

Historia de enfermedad tiroidea:

¿Ha sido medicado dentro de los últimos 3 meses previos a la toma de muestra (excluyendo antiparasitarios)?

Si la respuesta es sí, marque cuál:

Antiinflamatorios (AINES)

Corticoides

Trimetoprim sulfa

Anticonvulsivantes

Anticonceptivos

Otro (¿cuándo?)

¿El animal ha cumplido con las 8 horas de ayuno (con acceso a agua)? SI NO
¿Concurrió a consulta veterinaria por problemas de piel últimamente? (ej.:
comezón, pérdida de pelo), ¿cuándo?

13. ANEXO III

Criterios de inclusión
<p>Perros machos y hembras intactos, con edades comprendidas entre 3 meses y 10 años. Ayuno de 8 horas.</p> <p>Realización del cuestionario por parte del dueño (Ver ANEXO II) y aprobación del mismo.</p> <p>Perros que se consideraron clínicamente sanos en función de su historia clínica, anamnesis y examen físico.</p> <p>Ausencia de administración de fármacos que afecten los niveles séricos de hormonas tiroideas, TSH, colesterol y triglicéridos (incluyendo glucocorticoides, AINES, anticonvulsivantes, sulfonamidas u otros) en los últimos 3 meses previos a la toma de muestra.</p>
Criterios de exclusión
<p>Animales menores a 3 meses o mayores a 10 años</p> <p>Hembras preñadas, en lactación, o que estén recibiendo fármacos anticonceptivos</p> <p>Animales con examen físico con anormalidades y/o manifestación de enfermedad o con enfermedades identificadas a través de la anamnesis o historia clínica.</p> <p>Animales cuyos propietarios no hayan completado el cuestionario (Ver Anexo ...) o que el mismo no haya sido aprobado</p> <p>Animal al que se le haya administrado cualquier fármaco en los últimos 3 meses previos a la toma de muestra.</p> <p>Animales de razas que se conoce tienen niveles de hormonas tiroideas que se encuentran alejados del rango internacional: Greyhound (Gaughan y Bruyette., 2001), Scottish Deerhound (Sheerer y col., 2013), Basenji (Seavers y col., 2008), perros de trineo de Alaska (Lee y col., 2004) y Whippets (Van Geffen y col., 2006); y sus cruzas.</p>