

COMPARACIÓN DEL PERFIL TIROIDEO EN *Equus ferus caballus* (MAMMALIA: PERISSODACTYLA) POR GÉNERO Y EDAD*

José Henry Osorio¹, Felipe Ramírez² y Jorge Enrique Pérez³

Resumen

Objetivo: Comparar y analizar la correlación entre las concentraciones tiroideas séricas de 6 grupos de equinos (hembras jóvenes vs. machos jóvenes; hembras adultas vs. machos adultos; hembras jóvenes vs. hembras adultas; machos jóvenes vs. machos adultos; hembras vs. machos y jóvenes vs. adultos). **Materiales y métodos:** Se obtuvieron 99 muestras sanguíneas de caballos en estado de ayuno, diferenciados por género y edad (50 caballos menores de dos años: 25 hembras y 25 machos, y 49 caballos mayores de dos años: 25 hembras y 24 machos). Se determinaron los niveles de TSH y T4L mediante inmunoensayo enzimático. **Resultados:** Para el grupo de la fracción T4L según edad: jóvenes vs. adultos se encontró una diferencia significativa con un p-valor inferior a 0,05 igual a 0,005, con rangos promedio de 0,74 mg/dl jóvenes y 0,59 mg/dl adultos, con un nivel de confianza de 95%. De igual forma en el grupo de hembras jóvenes vs. hembras adultas en la fracción de T4L con rangos de 0,74 mg/dl y 0,56 mg/dl respectivamente, se halló una diferencia estadísticamente significativa con un p-valor inferior a 0,05 igual a 0,01. Para los demás grupos las diferencias en los valores de T4L y TSH, no fueron significativas ($P \geq 0,05$). **Conclusiones:** Los resultados sugieren que las hembras jóvenes presentan niveles séricos más altos de T4L.

Palabras clave: tiroides, metabolismo, caballos.

COMPARISON OF THYROID PROFILE IN *Equus ferus caballus* (MAMMALIA: PERISSODACTYLA) BY GENDER AND AGE

Abstract

Objective: To compare and analyze the correlation between serum thyroid concentrations of 6 groups of horses (young females vs. young males; adult females vs. adult males; young females vs. adult females; young males vs. adult males; females vs. males, and young vs. adults). **Materials and Methods:** Blood samples were obtained from 99 horses in the fasting state, differentiated by gender and age (50 horses under two years: 25 females and 25 males, and 49 horses over two years: 25 females and 24 males). Levels of THS and free T4 were measured by enzymatic immunoassay. **Results:** For the FT4 by age group: significant difference for young vs. adults was found, with a p-value lower than 0.05 equal to 0.005, with 0.74 mg/dl and 0.59 mg/dl average ranks for young and adults respectively, with a confidence level of 95%. Similarly, statistically significant difference for young females vs. adult females was found in the FT4 fraction ranging from 0.74 mg/dl and 0.56 mg/dl respectively, with a p-value lower than 0.05 equal to 0.01. For the other groups, the differences in FT4 and TSH values were not significant ($P \geq 0.05$). **Conclusions:** The results suggest that young females present higher FT4 serum levels.

Key words: thyroid, metabolism, horses.

* FR: 2-III-2012. FA: 18-VIII-2013.

¹ Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. E-mail: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co,

² Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. E-mail: feraec@hotmail.com

³ Laboratorio de Microbiología, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. E-mail: labmicro@ucaldas.edu.co

INTRODUCCIÓN

La circulación de las hormonas tiroideas en la sangre aparece de una manera pulsátil, la cual es distinta según la especie (especie específico) con distintas variaciones ontogénicas, lo cual es responsable de la variación morfológica individual y del comportamiento sexual de cada animal (CROCKFORD, 2003. La síntesis y secreción las Hormonas Tiroideas (THs) es regulada por un sistema de retroalimentación negativo basado en el eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT). La síntesis y secreción de la hormona tiroidea es incitada por la hormona estimulante de la tiroides tirotropina (TSH) (TORIBIO & DUCKETT, 2004). Las concentraciones de TSH dependen de la tasa de dispersión de las THs y los niveles de TSH en la circulación al igual que en la medida que la Tetrayodotironina (T4) se convierte en Triyodotironina (T3) (BREUHAUS, 2011). Toda la T4 circulante es derivada directamente de la glándula tiroides. Solo un 10% a un 20% de la T3 circulante es secretada directamente de la glándula tiroides (HALLERMEIER *et al.*, 1998). Las hormonas, ya sea ligadas o libres, están listas para atravesar el endotelio capilar y ejercer sus efectos biológicos en los tejidos tisulares. La proteína fijadora tiene como propiedad determinar la actividad biológica de cada hormona (BUFF *et al.*, 2007). En los caballos los porcentajes de T4 circulante ligado a la globulina fijadora de tiroxina equivale a un 61%, ligado a prealbúmina fijadora de tiroxina un 22% y T4 fijada a albúmina un 17% (BUFF *et al.*, 2007). La T3 también corre ligada a la globulina fijadora de tiroxina y albúmina pero no se liga a la prealbúmina fijadora de tiroxina. Estas hormonas son unidas de manera reversible a las proteínas transportadoras, quienes actúan como reservorios de TH (KRATZSCH & PULZER, 2008). La principal acción de las hormonas tiroideas es estimular el consumo de oxígeno. Las THs estimulan la síntesis y el catabolismo de proteínas, ayudan a regular el metabolismo lipídico, el metabolismo basal y la producción de calor corporal (HULBERT, 2000). Estas hormonas no son esenciales para la vida pero juegan un papel importante en el crecimiento y maduración del organismo (BREUHAUS, 2011). Cuando existe un desbalance en las concentraciones de THs ya sea exceso o deficiencia de las mismas, se manifiestan las patologías conocidas como hipotiroidismo e hipertiroidismo, las cuales se identifican por una sintomatología precisa relacionada con el metabolismo basal y las demás funciones que desempeñan estas dentro del organismo; por medio de este estudio se analizaron los niveles de T4L y TSH en el suero de los equinos, lo cual es fundamental al momento de diagnosticar una de estas enfermedades pues teniendo un rango promedio de los niveles de las hormonas, se reconoce si existe o no una alteración a nivel de la glándula tiroides o del eje HPT, que altere el metabolismo tiroideo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 99 muestras de sangre de equinos criollos y de razas puras, en el departamento del Valle, departamento de Risaralda y departamento de Caldas. 50 caballos menores de dos años (25 hembras y 25 machos) y 49 caballos mayores de dos años (25 hembras y 24 machos). Las muestras fueron obtenidas en un estado de ayuno de 12 horas y recolectadas en tubos de ensayo sin anticoagulante. La sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos y el suero se congeló a -30°C. Las muestras se llevaron a una temperatura de 37°C por 10 minutos. Para la determinación del T4 libre, se utilizó la prueba de inmunoensayo enzimático competitivo (Accubind T4L, Monobind Inc©); brevemente, los sueros fueron colocados en contacto con

una fase sólida que contenía anticuerpos contra la T4, a la cual se le agregó el conjugado compuesto por T4 libre unido a peroxidasa de rábano (HRP); luego de 1 hora de incubación a temperatura ambiente se hizo un lavado para liberar aquellas moléculas no unidas, y se agregó el substrato formado por una mezcla de tetrametil bencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno disuelto en buffer de acetato, con una incubación de 15 minutos, tiempo al cabo del cual se detuvo la reacción al agregarle una solución de ácido clorhídrico 1N. La lectura se hizo en un equipo lector de microelisas (Titertek multiscan™) a una absorbancia de 450 nm; las absorbancias obtenidas de los estándares se graficaron junto con las concentraciones y de la curva de calibración se obtuvieron las concentraciones de T4 libre de las respectivas muestras. Para la determinación de los niveles de TSH (Hormona Estimulante del Tiroides), se utilizó una prueba de inmunoensayo enzimático colorimétrico tipo sandwich, utilizada para la cuantificación del TSH de origen humano (Accubind TSH-Monobind Inc®); brevemente, a una placa de 96 pozos que tenía unidos anticuerpos monoclonales contra la TSH en una interacción estreptavidina-biotina, se le agregó una alícuota de suero obtenido de las ovejas y una alícuota de conjugado compuesta de un anticuerpo policlonal contra la TSH unido a la peroxidasa de rábano; se incubó dos horas a temperatura ambiente, tiempo al cabo del cual se lavó la placa con una solución de fosfatos para eliminar todas aquellas moléculas no unidas, y se agregó el substrato formado por una mezcla de tetrametil bencidina (TMB) y de peróxido de hidrógeno; gracias a la presencia de la enzima en el complejo inmune previamente formado, se produjo la generación de oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno el cual, al actuar sobre la tetrametil bencidina, generó un cambio de color cuya intensidad es proporcional a la concentración de la hormona; para detener la reacción enzimática luego de un periodo de incubación de 15 minutos se agregó ácido clorhídrico 1N y posteriormente se procedió a hacer la lectura en un fotómetro lector de microelisas (Titertek multiscan™) a una longitud de onda de 450 nm; los resultados obtenidos de los estándares se graficaron frente a sus concentraciones generándose una curva de calibración en la cual se pudieron obtener las concentraciones de cada uno de los sueros probados. Los resultados fueron analizados a través del programa Statgraphics Plus 5.1. Se establecieron 6 grupos de acuerdo con el género y la edad, de la siguiente manera: hembras jóvenes vs. machos jóvenes; hembras adultas vs. machos adultos; hembras jóvenes vs. hembras adultas; machos jóvenes vs. machos adultos; hembras vs. machos y jóvenes vs. adultos. La comparación entre determinados grupos se llevó a cabo por medio del análisis de varianza ANOVA simple, con el cual se obtuvo el promedio, la varianza, la desviación estándar y el rango mínimo y máximo para cada una las siguientes variables: T4L y TSH en cada uno de los 6 grupos. Se aceptaba diferencia estadísticamente significativa cuando P valor es < 0,05.

RESULTADOS

De acuerdo con los valores obtenidos por los grupos descritos anteriormente, se encontró que los caballos jóvenes (hembras y machos) tenían mayores concentraciones séricas de T4L comparados con los equinos adultos, con una diferencia estadísticamente significativa (0,74 y 0,59 mg/dl), con un p-valor de 0,005. Sin embargo, en este mismo grupo no se halló diferencia estadísticamente significativa en los niveles séricos de TSH con valores de 0,04 y 0,07 mg/dl, jóvenes y adultos respectivamente. También se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de hembras jóvenes vs. hembras adultas, con valores de

T4L de 0,74 mg/dl y 0,56 mg/dl respectivamente, con un p-valor igual a 0,01. En el grupo de machos vs. hembras los hallazgos de T4L son equivalentes con promedios de 0,65 mg/dl y 0,68 mg/dl respectivamente. Los niveles de T4L en los grupos de machos jóvenes vs. machos adultos, hembras vs. machos no evidencian diferencias representativas. Las concentraciones de TSH para los distintos grupos analizados no demuestran diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

La importancia de este estudio incide en la aplicación a la medicina veterinaria, en particular para el diagnóstico clínico de las enfermedades de la glándula tiroides, ya sea hipertiroidismo o hipotiroidismo, siendo el último con mayor presentación en los equinos. Los resultados encontrados en esta investigación, concluyen que las hembras jóvenes presentan niveles de T4L mayores a las hembras adultas, y a su vez que tanto machos como hembras jóvenes revelan concentraciones más elevadas que los caballos adultos. Sin embargo, luego de establecer un rango promedio de las concentraciones séricas de las THs, y determinar las diferencias entre los distintos grupos, se deben tener en cuenta los muchos factores que alteran las concentraciones séricas de estas hormonas, pues siempre y cuando se ignoren las distintas condiciones ambientales, alimentarias y sociales que influyen sobre la condición hormonal de la especie no se podrá establecer con exactitud la presencia o ausencia de patologías endocrinas, en este caso el hipotiroidismo. Según estudios realizados, en algunas ocasiones se encuentran menos concentraciones de T4 en suero en caballos que sufren de síndrome metabólico equino (SME), y este hallazgo se correlaciona con las concentraciones de insulina en el plasma (DONALD *et al.*, 2011) donde se reportó una débil correlación negativa ($r = -0,22$; $P < 0,001$) en las concentraciones de insulina y T4 en caballos con SME (HURCOMBE, 2011). Las concentraciones de THs en plasma, se pueden aumentar por estados fisiológicos no asociados a signos clínicos anormales, como en la preñez debido a los altos requerimientos por parte del feto para su desarrollo (HALLERMEIER *et al.*, 1998). Se ha reportado una disminución en las concentraciones de T4 durante los primeros 16 días de vida de los potros, de T4L durante los 3 primeros meses de vida, con concentraciones de T3 en suero elevadas por encima de la de adultos las primeras 6 a 12 horas de vida, declinando significativamente luego de 24 horas de vida (DOUGLAS, 1999). Asimismo, se ha reportado que las concentraciones de T3 en plasma disminuyen 7,9 ng/ml desde el nacimiento a 0,9 ng/ml a los 6 meses de edad y a 0,7 ng/ml a los 9 meses de edad. También las concentraciones de T4 disminuyen de 233 ng/ml al nacimiento a 49 ng/ml a los 14 días y a 35 ng/ml a los 6 meses (DOUGLAS, 1999). Otros autores reportan que las concentraciones de THs en los géneros no son significativas, sin embargo si se hallan diferencias entre los estadios reproductivos de las hembras donde aquellas yeguas que se encontraban en gestación presentaban niveles superiores de THs, se cree que probablemente sea por un aumento de las concentraciones de tiroglobulina durante el periodo gestante (MESSER *et al.*, 1998). Por lo tanto, las concentraciones de tiroxina son significativamente mayores en las hembras entre los días 49 y 55 de gestación comparado con otras hembras en gestación avanzada (BOOSINGER *et al.*, 1995; FRANK *et al.*, 2002). Es importante recalcar la estación del año en la cual se miden los niveles de THs, ya que si es una estación fría se van a encontrar resultados incrementados (HULBERT, 2000). Investigaciones recientes concluyen que cuando hay inanición se produce una disminución mayor al 50% de T3 y T4 en suero en solo 1 a 2 días (TORIBIO, 2011). Luego de suministrar una alimentación con un alto

porcentaje de energía y de proteína en los potros destetos de 6 a 8 meses de edad, la conversión periférica de T4 a T3 resultó en una disminución relativa de T4 3 horas posteriores a la alimentación (MESSER *et al.*, 1998). La acelerada conversión de T4 a T3 luego de la alimentación rica en carbohidratos, se relaciona con el incremento en la secreción de insulina debido al aumento de glucosa, ya que la insulina acelera la desyodación de T3 (FURR *et al.*, 1992). En los equinos la existencia de biorritmos en la secreción de las hormonas también sigue siendo estudiada en la actualidad, situación que está directamente influenciada por la actividad que desarrollan los animales (sedentarios, de trabajo, de competencia); por ende, es muy importante dilucidar si existen o no cambios circadianos significativos en los niveles hormonales cuando los caballos sedentarios empiezan una rutina de entrenamiento (MEDICA *et al.*, 2011); investigaciones anteriores han reportado el cambio estacional de yodotironinas (CHRISTENSEN *et al.*, 1997; FAZIO *et al.*, 2007). Se han reportado variaciones a lo largo del día de las yodotironinas (DUCKETT *et al.*, 1989), sin embargo esta situación no ha sido bien aclarada pues son muchos los factores que alteran los ciclos hormonales de un caballo, sobre todo cuando este se encuentra sometido a un régimen de ejercicio (BARAGLI *et al.*, 2011), al estrés por cambios en la alimentación, desplazamientos, cambios de pesebrera y demás factores (FAZIO *et al.*, 2007; MEDICA *et al.*, 2011). Las investigaciones reportan que para el diagnóstico de enfermedad tiroidea, la mejor herramienta es la medición de T4L en suero por diálisis (TORIBIO & DUCKETT, 2004; BREUHAUS & LAFEVERS, 2005; BREUHAUS, 2011). La determinación de los niveles de TSH en suero se considera estratégica para evaluar la funcionalidad de la glándula tiroides, ya que es muy eficiente y de un costo favorable (TORIBIO & DUCKETT, 2004). La TSH sirve para evaluar si la lesión corresponde al eje HPT o a la glándula tiroides como tal, donde se reporta que con unos niveles de T3T, T4T y T4L bajos acompañados de TSH en altas concentraciones indica un hipotiroidismo primario (a nivel de la glándula) (FRANK *et al.*, 2002). Según estudios realizados, animales que al examen reporten niveles que sean inferiores a los 1,5 mg/dl de T4 se consideran hipotiroideos (ABRAHAM *et al.*, 2011), pero son más precisos los métodos utilizados para medir los niveles séricos de las THs libres, ya que siempre y cuando se encuentren ligadas a proteína (albúmina, prealbúmina) se van a observar resultados modificados por el metabolismo proteico precedente a la toma de la muestra (TORIBIO & DUCKETT, 2004). Además de la medición de THs, se realizan test que incluyen las mediciones de las concentraciones de hormona tiroidea antes y después de la aplicación de TRH o TSH para estimular la producción de THs (BREUHAUS, 2011). Cuando se analizan los niveles de tiroxina se puede diagnosticar la presencia de disfunción primaria de la tiroides, ya que un deficiente incremento de tiroxina es un indicador de esta alteración (TORIBIO & DUCKETT, 2004). La administración de fenilbutazona en los caballos, disminuye las concentraciones de las hormonas tiroideas pero no afecta el test de estimulación de TSH, además la dexametasona disminuye las THs en el test de respuesta de TSH (TORIBIO & DUCKETT, 2004). En el test de estimulación con TRH, si se observa una respuesta baja de TRH sugiere disfunción a nivel de la glándula pituitaria (DIVERS, 2008). Las concentraciones basales de THs bajas con concentraciones altas de TSH y una respuesta anormal (baja) al test de estimulación de TSH, sugieren disfunción de la glándula tiroides. Bajos niveles de THs basales con una concentración normal o baja de TSH, sugieren disfunción de la glándula pituitaria o del hipotálamo. Bajos niveles de TH y TSH basales con respuesta al test de TRH, pueden sugerir disfunción hipotalámica como causa de hipotiroidismo. El test de estimulación de TRH ha sido usado para diagnosticar adenomas pituitarios en caballos (TORIBIO & DUCKETT, 2004).

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, G.G. *et al.*, 2011.- Serum thyroid hormone, insulin, glucose, triglycerides and protein concentrations in normal horses: Association with topical dexamethasone usage. *Vet J.*, 188: 307-312.
- BARAGLI, P. *et al.*, 2011.- Early evidence of the anticipatory response of plasma catecholamine in equine exercise. *Equine Vet J.*, 31: 85-88.
- BOOSINGER, T.R.; BRENDENMUEHL, J.P.; BRANSBY, D.L. *et al.* 1995. Prolonged gestation, decreased triiodothyronine concentration, and thyroid gland histomorphologic features in newborn foals of mares grazing Acremonium coenophialum-infected fescue. *Am J Vet Res*, 56, 66-9
- BREUHAUS, B.A., 2011.- Disorders of the Equine Thyroid Gland. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, 27 (1): 115-128.
- BREUHAUS, B.A. & LAFEVERS, D.H. 2005. Thyroid function in normal, sick and premature Foals [abstract]. *J Vet Intern Med*, 19, 445.
- BUFF, P.R. *et al.*, 2007.- Seasonal and pulsatile dynamics of thyrotropin and leptin in mares maintained under a constant energy balance. *Domestic Animal Endocrinol.*, 33: 430-436.
- CHRISTENSEN, R.A. *et al.*, 1997.- Acute effects of short-term feed deprivation and refeeding on circulating concentrations of metabolites, insulin-like growth factor i, insulin-like growth factor binding proteins, somatotropin, and thyroid hormones in adult geldings. *J Anim Sci.*, 75: 1351-1358.
- CROCKFORD, S.J., 2003.- Thyroid rhythm phenotypes and hominid evolution: a new paradigm implicates pulsatile hormone secretion in speciation and adaptation changes. *Comp Biochem Physiol AMol Integr Physiol.*, 135: 105-129.
- DIVERS, J.T., 2008.- Endocrine Testing in Horses: Metabolic Syndrome and Cushing's Disease. *Equine Vet J.*, 28 (5): 315-316.
- DONALD E.G. GRIESDALE, RUSSELL J. DE SOUZA, ROB M. VAN DAM. *et al.*, 2008.- Intensive insulin therapy and mortality among critically ill patients: a meta-analysis including NICE-SUGAR study data. *CMAJ.* 180(8): 821-827.
- DOUGLAS, R. 1999.-Circadian cortisol rhythmicity and equine cushing's-like disease. *Equine Vet J*, 19(11), 684, 750-751, 753.
- DUCKETT WM. 1989. Thyroid gland. *Equine internal medicine.* 917-923.
- FAZIO, E. *et al.*, 2007.- Total and free iodothyronine levels of growing Thoroughbred foals: Effects of weaning and gender. *Livestock Science*, 110 (3): 207-213.
- FRANK, N. *et al.*, 2002.- Equine thyroid dysfunction. *Vet Clin Equine*, 18: 305-319.
- FURR, M.O.; MURRAY, M.J. & FERGUSON, D.C. 1992. The effects of stress on gastric ulceration, T3, T4, reverse T3 and cortisol in neonatal foals. *Equine Vet J*, 24, 37-40.
- HALLERMEIER KM, WU SM, STRATAKIS CA, CHAN CHY, BOURDONY CJ, RENNERT OM, *et al.*, 1998.- Genetic heterogeneity of adrenocorticotropin (ACTH) resistance syndromes: identification of a novel mutation of the ACTH receptor gene in hereditary glucocorticoid deficiency. *Mol Genet Metab.*, 64:256-65.
- HULBERT, A.J., 2000.- Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol. Rev.*, 75: 519-631.
- HURCOMBE, S.D., 2011.- Hypothalamic-Pituitary gland axis function and dysfunction in horses. *Vet Clin Equine*, 27: 1-17.
- KRATZSCH, J. & PULZER, F., 2008.- Thyroid gland development and defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 22 (1): 57-75.
- MEDICA, P. *et al.*, 2011.- 24-hour endocrine profiles of quarter horses under resting conditions. *Equine Vet J.*, 31: 35-40.
- MESSER, N.T. *et al.*, 1998.- Thyroid Hormone Levels in Thoroughbred Mares and Their Foals at Parturition. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 44: 248-251.
- TORBIO, R.E., 2011.- Endocrine dysregulation in critically ill foals and horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, 27 (1): 35-47.
- TORBIO, R.E. & DUCKETT, W.M., 2004.- *Equine Internal Medicine.* Estados Unidos de América: Saunders.