

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PAULA BARBOSA COSTA

**PESQUISA DE SANGUE OCULTO FECAL EM CÃES COM
HIPERCORTISOLISMO PITUITÁRIO-DEPENDENTE**

UBERLÂNDIA
2023

PAULA BARBOSA COSTA

**PESQUISA DE SANGUE OCULTO FECAL EM CÃES COM
HIPERCORTISOLISMO PITUITÁRIO-DEPENDENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal
Orientadora: Profa. Dra. Sofia Borin Crivellenti

Uberlândia, 16 de abril de 2023.

Profa. Dra. Sofia Borin Crivellenti (Orientadora) – UFU

Profa. Dra. Mariana Cristina Hoepfner Rondelli - UFPel

Prof. Dr. Nathan da Rocha Neves Cruz – Centro Universitário Barão de Mauá

Prof. Dr. Marcio Machado Costa - UFU

Prof. Dr. Matheus Matioli Mantovani - UFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837p
2023

Costa, Paula Barbosa, 1992-
Pesquisa de sangue oculto fecal em cães com hipercortisolismo
pituitário-dependente [recurso eletrônico] / Paula Barbosa Costa. - 2023.

Orientadora: Sofia Borin Crivellenti.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.7037>
Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Crivellenti, Sofia Borin, 1983-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Glória Aparecida
Bibliotecária Documentalista - CRB-6/2047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória , Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO PPGCVET Nº 06/2023				
Data:	16 DE MAIO DE 2023	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	12:15
Matrícula do Discente:	11913VET012				
Nome do Discente:	PAULA BARBOSA COSTA				
Título do Trabalho:	Pesquisa de sangue oculto fecal em cães com hipercortisolismo pituitário-dependente				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	CLÍNICA MÉDICA, CIRURGIA E MORFOLOGIA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	AVALIAÇÕES CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS, DIAGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS DAS MOLÉSTIAS CLÍNICAS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS				

Reuniu-se por videoconferência a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Marcio Machado Costa (FAMEV/UFU); Matheus Mاتيoli Mantovani (FAMEV/UFU); Nathan da Rocha Neves Cruz (Centro Universitário Barão de Mauá/CUBM); Mariana Cristina Hoepfner Rondelli (UFPEl); Sofia Borin Crivellenti (FAMEV/UFU), orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Sofia Borin Crivellenti, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Sofia Borin Crivellenti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/05/2023, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Matioli Mantovani, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/05/2023, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nathan da Rocha Neves Cruz, Usuário Externo**, em 18/05/2023, às 09:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcio Machado Costa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/05/2023, às 09:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Cristina Hoeppner Rondelli, Usuário Externo**, em 18/05/2023, às 14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4503209** e o código CRC **354C5027**.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

PAULA BARBOSA COSTA - Nascida em Sertãozinho, estado de São Paulo, em 12 de janeiro de 1992, filha de Carlos Alberto Costa e Maria da Graça Camargo Barbosa Costa. Médica Veterinária, graduada em dezembro de 2014 pela Faculdade Fundação Educacional de Ituverava (FAFRAM). Possui aprimoramento em Medicina Intensiva (CETAC- São Paulo). Completou o programa de Residência em Clínica Médica de Animais de Companhia, atuando como Médica Veterinária Residente durante 2 anos sobre o Programa de Aperfeiçoamento Profissional na Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca, SP. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU-MG) com ênfase em endocrinologia. Em 2019, iniciou o doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal. Faz parte do Corpo Clínico do Serviço de Endocrinologia em cães e gatos do Hospital Veterinário - UFU desde 2017. Possui experiência nas seguintes áreas: clínica médica de pequenos animais com enfoque na endocrinologia e metabologia e medicina de felinos.

"Há muitas pessoas que se preocupam com o fim de suas vidas; elas deviam se preocupar mais em dar um verdadeiro significado à vida que têm, uma verdadeira utilidade. Eu acredito que alma nenhuma está realmente perdida e que todos nós iremos alcançar nosso destino. Mas se formos julgados algum dia, eu não tenho dúvida de que a pergunta vai ser: "*Quanto você amou?*" Ninguém vai nos perguntar: "*Quanto você ganhou?*", e sim, "*Quanto você deu aos outros?*" A grandeza aparente não será importante, somente aquilo que doamos é que vai contar."

(*O retorno do jovem príncipe – poeta argentino*
A. G. Roemmers)

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Graça, e aos meus amados pacientes
caninos e felinos.
Ser veterinária é a única certeza que sempre senti.

AGRADECIMENTOS

Nesta parte escrevo com o coração, abandonando a parte técnico-científica. Essa parte não têm desvio-padrão, não têm estatística ou metodologia para descrever sobre o sentimento de gratidão.

Acredito que sem a fé em Deus e na espiritualidade não estaria aonde estou. Finalizar um ciclo de 1.460 dias me faz refletir que a pessoa que entrou, não é a mesma pessoa que sai. E, quando penso naqueles que estão comigo até agora, sei que posso contar com eles para o sempre (e eles, comigo!). Obrigada Deus, por me fazer reencontrar em todas vezes que me senti desamparada, e por colocar e me permitir viver com essas pessoas tão importantes pra minha vida.

Agradeço minha família, que essa, é a minha base e minha explicação do que eu sou. Sou grata a vocês por trilharem meu caminho até aqui. E sinto que, todas vezes que eu precisar, posso seguir para o caminho de casa, que vocês estarão aí, me esperando como sempre fizeram. Obrigada pai, mãe e irmãos, Carla e Fernando, é muito bom (e essencial) ter vocês aqui comigo!

Agradeço ao Osório Dias Neto, meu parceiro nesta caminhada. Ainda continuamos sem entender o porquê a vida nos uniu, mas não tenho dúvidas do quanto esse amor nos engrandeceu de forma individual e juntos. Obrigada por estar do meu lado nos dias enlouquecidos de afazeres, cansados e desanimadores, talvez sejam nestes dias que devemos considerar o verdadeiro valor da pessoa.

Agradeço aos meus familiares e amigos de vida por me transformar e complementar minha essência. É uma das hélices da vida, que se faltar, a vida não gira. Não transforma a energia em memórias, abraços, sorrisos e lágrimas. Espero que minha ausência para alguns, não significa falta de cuidado com amizade. Mudando um pouco o ditado, acredito que o quê é verdadeiro, é sempre lembrado! Obrigada por me entenderem, pelas memórias afetivas construídas e por estarem aí, exatamente aonde estão, abrindo seus corações quando eu preciso entrar. É recíproco essa moradia por aqui. Mesmo o tempo e as circunstâncias da vida não sendo a favor, o café da tarde ou “breja” sempre serão cobrados. Aqui dedico em especial para minha melhor amiga de vida, Patrícia Scarabucci, o sentimento mais genuíno que academia me presenteou.

Agradeço aos pós-graduandos e em especial, parceiros de profissão na medicina veterinária (centros veterinários e clínicas como Triovet, Feira dos Animais, Vetcenter, PSV, Spécialité em especial a Dra Christina Resende Martins), pela confiança no meu trabalho e experiências profissionais. Essa inter-relação reafirma a importância das especialidades veterinárias.

Agradeço uma das pessoas que, mesmo com as minhas dificuldades encontradas pelo caminho, continuou acreditando em mim. Me deu carta branca para ser o que eu queria ser, e este gesto traduzi em confiança e apoio para mim. Obrigada professora Sofia Borin Crivellenti por toda luta, empatia e compreensão. Não preciso contar a chuva de inspiração que é você - e faz por onde na área da medicina veterinária e na endocrinologia veterinária, alcançou polos renomados como a Associação Brasileira de Endocrinologia Veterinária (ABEV) e pesquisas no ramo. E esta última,

agradeço em participar! Dizer seu nome como orientadora ecoa longe, e o que espero, quando eu disser que foi minha orientadora, possa te tirar um sorriso e afago no coração pela saudade deixada. Obrigada pelos ensinamentos e acolhimento no mestrado que me proporcionou e pela persistência que teve comigo no doutorado. Reconheço sua batalha na tentativa de me proporcionar um auxílio financeiro no primeiro ano do doutorado. Considero seu esforço em me manter na sua equipe. E, ao relembrar nosso caminho, minha gratidão transforma-se em lágrimas. Não foram 6 anos trilhados juntos como apenas pesquisadoras, também tivemos momentos de uma olhar para a outra como duas pessoas, mulheres, humanas! Quando lembro da sua vida inicial em Uberlândia vibro de alegria pelas suas conquistas e por você estar pertinho de quem queria. Hoje compreendo suas palavras sobre o futuro, visão acadêmica e como eu a agradeço por partilhá-las comigo. Foi muito linda nossa trajetória! E finalizando, meus agradecimentos a Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), aos funcionários (de recepção, de limpeza, prestadores de serviços), ao laboratório de Patologia Clínica HV-UFU (primordialmente às residentes Karolinnna Lourenço da Silva e Ana Carolina Guimarães Fenelon), ao diretor do Hospital Veterinário da UFU - Profº. Drº. Diego Delfiol, a *todos professores* que passaram por minha vida, aos responsáveis dos pacientes estudados e ao Serviço de Endocrinologia Veterinária (Hévila, Luana e Fernanda), a presença de todos foi importante para conclusão desta etapa.

Muito obrigada!

RESUMO

Dentro da área de clínica médica de pequenos animais, as doenças endócrinas ganham a atenção. A superexposição do cortisol endógeno, denominada como hipercortisolismo, é a terceira endocrinopatia mais diagnosticada. A tese foi fracionada em três capítulos, sendo o primeiro referente às considerações gerais sobre o hipercortisolismo e os efeitos nocivos do cortisol sérico, bem como a ação dele no sistema gastrointestinal e o método diagnóstico teste de sangue oculto fecal (TSOF) como triagem laboratorial precoce para averiguar danos teciduais em tal mucosa. O segundo capítulo objetivou investigar e comparar a sensibilidade analítica dos testes de detecção de sangue oculto fecal baseados nos reagentes guáiacó e benzidina na identificação de sangue em amostras fecais obtidas de caninos saudáveis, forjadas com quantidades conhecidas de sangue do próprio animal (hemoglobina/g fezes). Para avaliação adicionava-se concentrações de hemoglobina/g (Hb/g) fezes (1, 5, 10, 20, 40 µg) e testadas pelos dois testes citados. Três patologistas realizaram a leitura das amostras fotografadas de forma duplo-cega. A análise dos resultados demonstrou o gTSOF como melhor desempenho nos quesitos de sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo, razões de verossimilhanças positiva, negativa e precisão. O terceiro capítulo objetivou investigar a presença de SOF pelo método guáiacó nos caninos com hipercortisolismo pituitário-dependente (HCPD) em dois grupos; nos hipercortisolêmicos (recém-diagnosticados e tratados não compensados – controle positivo) e nos normocortisolêmicos (tratados compensados,

controle negativo). Os resultados foram interpretados também por três avaliadores às cegas e analisados com vistas à três diferentes cenários. Estes foram idealizados com o objetivo de verificar se há ou não presença de SOF em cães com hipercortisolismo espontâneo [Cenário 1; de modo que escore 0=0 (ausência de SOF) e escores 1, 2, 3=1 (presença de SOF)], reduzir um possível efeito da alta sensibilidade do gTSOF para quantidades mínimas de hemoglobina presentes em amostras fecais (< 1 mg Hb/g fezes) observadas em estudo piloto (Capítulo 2) ou ainda de variabilidades individuais na classificação do escore 1 de SOF [Cenário 2; onde escores 0 e 1=0 (ausência de SOF) e os escores 2 e 3=1 (presença de SOF)] e verificar a aplicabilidade dos escores originalmente propostos, nos quais o escore 0 representa “ausência” de SOF e os escores 1, 2 e 3 são considerados fraco, moderado e forte positivos para SOF (Cenário 3). Verificou-se que, embora em todos os cenários propostos, tenha havido certo grau de concordância não aleatória entre os avaliadores, esta não foi forte em nenhum momento ($\kappa > 0,61$), gerando questionamentos a respeito da variabilidade de resultados colorimétricos obtidos no gTSOF. Não foi possível afirmar que o hipercortisolismo em si esteja relacionado ao achado de sangramento oculto fecal em cães portadores de HCPD (Cenários 1 e 3). Porém, quando uma alta sensibilidade do gTSOF foi aventada (Cenário 2) e o escore levemente positivo (escore 1) foi reclassificado como sendo negativo, a proporção de animais com ausência de SOF (resultado negativo) foi significativamente superior a proporção de animais com presença de SOF (resultado positivo), tanto nos cães com HCPD

hipercortisolêmicos, quanto nos normocortisolêmicos ($p=0,001690$ e $p=0,004343$, respectivamente), indicando não haver SOF em cães com HCPD. Assim, diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, não é possível afirmar que existe sangramento oculto fecal pelo método guáiacó em cães portadores de hipercortisolismo pituitário-dependente, sejam eles hipercortisolêmicos ou normocortisolêmicos.

Palavras-chave: Caninos, hipercortisolismo, sangramento gastrointestinal, sangue oculto fecal

ABSTRACT

In the small animal clinical practice, endocrine diseases are a subject of attention. The overexposure of endogenous cortisol, called hypercortisolism, is the third most diagnosed endocrinopathy. This thesis is divided in three chapters, the first refers to general considerations about hypercortisolism and the damaging effects of serum cortisol, its action in gastrointestinal system and the diagnostic method of fecal occult blood test (FOBT) as an early screening for tissue damage in gut mucosa. The second chapter aimed to investigate and to compare the analytical sensitivity of FOBT detection tests based on guaiac and benzidine reagents for the identification of blood in faecal samples obtained from healthy dogs. Those feces were forged with known amounts of the animal's own blood (hemoglobin/g faeces). Hemoglobin was added at 1, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/g}$ of feces and tested by both methods aforementioned. Three pathologists performed the reading of the photographed samples in a double-blinded manner. The analysis of the results showed that gFOBT had greater sensitivity, positive and negative predictive values, positive and negative likelihood ratios and accuracy. The third chapter aimed to investigate the presence of FOBT by the guaiac method in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism (HCPD) randomized in two groups: hypercortisolemic dogs (recently diagnosed, pharmacologically uncontrolled - positive control) and normocortisolemic (pharmacologically controlled, negative control). The results were also interpreted by three evaluators (double-blindly) and analyzed according to different scenarios aiming to verify whether there is presence of FOB in dogs with

spontaneous hypercortisolism or not [scenario 1, 0=0 (absence of FOB) and scores 1, 2, 3=1 (presence of FOB)]. This method aimed to reduce a possible effect of the high sensitivity of gFOBT for minimum amounts of hemoglobin within faecal samples (<1mg Hb/g faeces) observed in a pilot study (Chapter 2), or even to reduce the individual variability in the classification of the score 1 [scenario 2, scores 0 and 1=0 (absence of FOB) and scores 2 and 3=1 (presence of FOB)] . Additionally, the method applied was able to verify the applicability of the originally proposed scores in which 0 represents "absence" of FOB and scores 1, 2 and 3 as weakly, moderately, and strongly positive for FOB (scenario 3). It was observed that, despite all the proposed scenarios, there was a certain degree of agreement between the evaluators, however they were not strong at any moment, which raised questions about the variability of the colorimetric results obtained. It was not possible to state that hypercortisolism itself is related to occult fecal bleeding in dogs with HCPD (scenarios 1 and 3) as the high sensitivity of the gFOBT was suggested (scenario 2) and the slightest positive score was reclassified as being negative. The proportion of animals with no FOB (negative score) was significantly higher than the those with FOB (positive score) in both hypercortisolemic and normocortisolemic HCPD dogs ($p=0.001690$ and $p=0.004343$, respectively), indicating the absence of FOB in dogs with HCPD. Thus, in the light of the results obtained in this research, it is not possible to declare that there is occult fecal bleeding by the guaiac method in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism, whether they are hypercortisolemic or not.

Keywords: Canine, hypercortisolism, guaiac, gastrointestinal bleeding, faecal occult blood

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Exemplificação das diversas manifestações clínicas pela superexposição endógena de glicocorticoides de origem HCPD em diferentes cães atendidos no Serviço de Endocrinologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). **a)** Nota-se a presença de pontos de calcificação distrófica e a flebectasia abdominal; **b)** Retrata o abdômen de cão com pele fina e frágil; **c)** cão com aumento da distensão abdominal pela severa hepatomegalia e presença de estrias; **d)** e **e)** figuras diferentes que retratam de forma diversa a mesma característica dermatológica, a calcinose cutânea.
- 11

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

≥	Maior ou igual
µg	Micrograma
µg/dL	Micrograma por decilitro
µg _{Hgb} /mL	Micrograma hemoglobina por mililitro
µg/kg	Micrograma por quilograma
α-MSH	Hormônio estimulador dos melanócitos
3 β-HSD	3β hidroxisteroide desidrogenase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ACTHe	Hormônio adrenocorticotrófico endógeno
ACTH-R	Hormônio adrenocorticotrófico receptor específico
ACVIM	Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna
AD	Adrenal-dependente
ADH	Hormônio antidiurético vasopressina
ALT	Alanina aminotransferase
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AVP	Arginina vasopressina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
COX-1	Inibição da ciclooxigenase
CYP17	17α-hidroxilase/17,20-liase
ESVE	Sociedade Europeia de Endocrinologia Veterinária
FA	Fosfatase Alcalina
FDA	<i>Food Drug Medications</i>
GC(s)	Glicocorticoide(s)
GNAS	Proteínas G
HAC	Hiperadrenocorticismo
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HS	Hipertensão sistêmica
IC	Intervalo de confiança
PAI-1	Inibidor ativador do plasminogênio tipo 1
PD	Pituitária-dependente
PKA	Quinase A

POC	<i>Point of Care</i>
POMC	Pró-opiomelanocortina
PTTa	Tempo da atividade parcial tromboplastina
PVN	Hipotalâmico paraventricular
RCCU	Relação cortisol/creatinina urinário
RD2	Receptor de dopamina 2
SC	Síndrome de Cushing
SCE	Síndrome Cushing Ectópica
SGI	Sangramento gastrointestinal
SOF	Sangue oculto fecal
SST	Subtipos de receptores somatostatina
TAs	Tumores nas adrenais
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TSBD	Teste de supressão com baixa dose dexametasona
tSOF	Testes de sangue oculto fecal
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

Sumário

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. Introdução	2
2. Objetivos	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. Revisão de literatura	5
4. Hipercortisolismo canino	5
4.1. Regulação da secreção de glicocorticoides (GCs)	5
4.1.1. Hormônio liberador de corticotrofina (CRH)	5
4.1.2. Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)	5
4.1.3. Dopamina	6
4.1.4. Cortex Adrenal	6
4.2. Classificação e etiopatogenia do HC conforme a ALIVE	7
4.2.1. Ocorrência natural HCACTH-dependente	7
4.2.2. Ocorrência natural HCACTH-independente	9
4.3. Epidemiologia	10
4.4. Manifestações clínicas do hipercortisolismo	12
4.5. Alterações multisistêmicas causadas pelos glicocorticoides	16
4.5.1. Ação dos glicocorticoides no sistema hematológico	16
4.5.2. Ação dos glicocorticoides no sistema renal	17
4.5.3. Alterações morfológicas no córtex da adrenal pelo hipercortisolismo	17
4.6. Testes específicos para diagnóstico de hipercortisolismo	18
5. Ação dos glicocorticoides no sistema gastrointestinal	20
6. Métodos de detecção de sangramento gastrointestinal (SGI)	21
7. Pesquisas que investigaram sangue oculto fecal (SOF) na medicina veterinária	24
Referências bibliográficas	26

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

A especialidade em endocrinologia alcança repercussão na medicina veterinária à medida que surgem descobertas científicas no ramo. Conforme aumenta a casuística das endocrinopatias em cães e gatos, aumenta a demanda de estudos nesta área em busca de melhorar a compreensão das doenças hormonais.

O hipercortisolismo (HC), atividade excessiva de glicocorticoides (GCs) exógenos ou endógenos devido ao cortisol, é a terceira desordem hormonal mais frequente em cães. O HC é a causa da Síndrome de Cushing (SC), um termo geral para uma série de síndromes clínicas. O projeto ALIVE, fundado pela Sociedade Europeia de Endocrinologia Veterinária (ESVE), criou essa classificação unânime para consolidar definições que sejam tão sólidas quanto possíveis do ponto de vista acadêmico e exequíveis na prática clínica. Pois então, atualmente, desencorajam os termos Doença de Cushing ou hiperadrenocorticismismo para o termo de referência desta síndrome clínica.

O cortisol, hormônio esteroidal, regula importantes funções celulares e respostas biológicas vitais por meio de diferentes estímulos (estresse, metabólico, inflamatório e ciclo circadiano). Quase todos os tecidos têm receptores para GCs, por causa disto o cortisol pode agir em quase todos os sistemas dos órgãos inclusive musculoesqueléticos, gastrointestinal (GI), cardiovascular, endócrino, neuropsiquiátrico, dermatológico, ocular e imunológico.

Como visto, é imprescindível a presença do cortisol no organismo, no entanto, a superexposição a ele a longo prazo pode causar efeitos fisiológicos multissistêmicos impactantes na vida do paciente e, mais especificamente, ser o responsável das diversas manifestações clínicas do hipercortisolismo. O esteroide leva ao desenvolvimento da miopatia por induzir a atrofia de fibras musculares sem induzir a necrose tecidual, à hipertensão estimulada pela secreção do sistema renina angiotensina aldosterona, à resistência insulínica decorrente a gliconeogênese hepática e glicogenólise muscular e à dislipidemia induzida pela síntese hepática de lipoproteínas (colesterol total, HDL e LDL e triglicerídeos). O aumento suprafisiológico do cortisol também causa mudanças na pele justamente por diminuir a síntese de colágeno polipeptídeo por fibroblastos caracterizando a atrofia cutânea. Complicações oculares são observadas em decorrência a

abundância do cortisol, no entanto, o motivo da lesão ocular depende da circunstância específica do caso e da localização da lesão causal primária do hipercortisolismo, por isso que, em casos de macrotumores hipofisários, a cegueira súbita é um diagnóstico diferencial para síndrome de Cushing. Úlceras gástricas não são incomuns em pacientes que tomam GCs, mas parecem ser raras em pacientes com hipersecreção de cortisol endógeno. No entanto, indução de úlceras pépticas por esteroide frequentemente é assintomática, mas caso contrário, os sintomas são aqueles geralmente vistos em úlcera péptica.

Sendo assim, já que a maior parte das úlceras podem estar em manifestação silenciosa, diante da ciência dos inúmeros efeitos nocivos dos GCs, bem como a consciência da ação ulcerogênica dos GCS exógenos no sistema gastrointestinal, pensou-se se o hipercortisolismo também seria capaz de causar o sangramento gastrointestinal (SGI) em cães e assim não ser dado como raro o desenvolvimento das úlceras pépticas e sim subdiagnosticadas.

Até o conhecimento dos autores, não existe pesquisa sobre detecção de SGI em cães com HC. Por isso, alavancou dados na literatura que mostrassem injúrias GI secundárias ao corticoide. Os Gcs são considerados como um fator de risco independente para diversas desordens gastrintestinais como formação de úlcera péptica, gastrite e sangramento gastrointestinal (SGI). O risco dessas lesões gastrintestinais aumentou significativamente quando os Gcs foram administrados com os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e outras complicações também foram demonstradas por essa associação medicamentosa como, por exemplo, perfuração visceral, esteatose hepática e a pancreatite. Por isso reafirmou a nossa curiosidade que, hipoteticamente, cães com hipercortisolismo poderiam desenvolver um real sangramento da mucosa gastrointestinal impercetível ao olho nu, pois, além de terem o cortisol alto, a pancreatite e esteatose são alterações concomitantes comuns encontradas no HC, logo, poderiam contribuir para futuras lesões gastrintestinais de origem metabólica.

Dados na literatura sobre detecção de sangramento gastrointestinal precoce, apontaram os testes rápidos de sangue oculto fecal humanos sendo utilizados em animais como possíveis auxiliares na investigação inicial de perda de sangue oculto fecal (SOF). Trabalhos de 1990 até o ano 2021 apontaram o teste de sangue oculto fecal guáiacó como uma boa proposta de metodologia para detectar sangue oculto fecal em animais. Este teste é utilizado em programas de

rastreamento precoce de câncer de colorretal em humanos, e que por mais que os fatores pré-analíticos (medicações, dietas, temperatura do ambiente) podem influenciar na resposta dos testes, o custo, facilidade de uso e transporte se sobressaem às desvantagens. Em nosso outro trabalho mostrou sobre a performance do guáiaco em cães saudáveis, o mesmo apresentou bom desempenho analítico (94% de sensibilidade e 99% especificidade), significando que a chance de identificar um real sangramento gastrintestinal é alta bem como identificar pequenas quantidades de sangue.

A proposta de usar testes rápidos, que são baratos e de fácil manuseio tem sido um forte atrativo para o consumo aquisitivo na medicina veterinária. Os *Point of Care* (POC) são testes laboratoriais que podem ser realizados no local do atendimento veterinário. Essas tecnologias possibilitam acessibilidade aquisitiva e proporcionam resultados para auxiliar nas rápidas decisões clínicas. Pequenas amostras biológicas podem ser suficientes para ter um resultado. Desta forma, o uso do teste de sangue oculto fecal guáiaco (SOFg) poderia se encaixar nos critérios POC e assim, considerá-lo como um futuro teste laboratorial qualitativo para sangue oculto fecal validado em cães e gatos.

Por fim, esta tese objetivou trazer tópicos relevantes e atuais sobre o hipercortisolismo canino e suas definições conforme a ALIVE, manifestações clínicas do HC, descrição das múltiplas ações dos glicocorticoides no sistema gastrintestinal, métodos de detecção de sangramento gastrintestinal e, por último, pesquisas que investigaram SOF em cães e reflexões, de forma inédita, sobre a presença ou não de sangue oculto fecal em pacientes com hipercortisolismo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral revisar conceitos sobre HC em cães, além de atualidades sobre a fisiologia do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), etiopatogenia do HC, fisiopatogenia, triagem diagnóstica para HC, enfatizando o sistema gastrintestinal como uma novidade de atenção para clínicos veterinários. Além de elucidar a capacidade de ação dos glicocorticoides no sistema gastrintestinal como outro sistema a ser cuidado nos cães com hipercortisolismo.

2.2. Objetivos Específicos

Este trabalho objetivou investigar sangramento gastrointestinal oculto pelo método guáiaco em pacientes com hipercortisolismo.

3. Revisão de literatura

4. Hipercortisolismo canino

O hipercortisolismo (HC) é uma disfunção hormonal mais frequente nos cães e é originado por exposição prolongada de glicocorticoide endógeno ou exógeno. O diagnóstico não consiste em apenas um teste hormonal laboratorial de referência padrão isolado, mas sim em compiladas alterações clínicas, achados laboratoriais e provas de funções de adrenais (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019a; EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ENDOCRINOLOGY, [s.d.]).

4.1. Regulação da secreção de glicocorticoides (GCs)

4.1.1. Hormônio liberador de corticotrofina (CRH)

Sintetizado no hipotálamo, especificamente na região supra-óptica núcleo hipotalâmico paraventricular (PVN), o CRH estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na adeno-hipófise. Esse por sua vez, estimula a zona fasciculada da córtex adrenal a produzir o cortisol em primatas e corticosterona em roedores (INDA et al., 2017). O CRH é formado por 41 aminoácidos polipeptídeos de meia-vida longa (dura cerca de 60 minutos) (KLEIN, 2014), responde o efeito *feedback* negativo pelos GCs e consequentemente diminui o ACTH. Também produzida no núcleo supra óptico PVN, a arginina vasopressina (AVP) e a angiotensina II co-expressam e co-secretam neurônios CRH hipotalâmicos; por outro lado, a ocitocina inibe os mediadores CRH. No entanto, as influências doutros hormônios (AVP e ocitocina) ainda não foram descobertos nos cães (INDA et al., 2017).

4.1.2. Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)

A pró-opiomelanocortina (POMC) é o precursor responsável pela formação do ACTH e do hormônio estimulador dos melanócitos (α -MSH). O ACTH, produzido na adeno-hipófise ou *parts distalis*, é composto por 39 peptídeos aminoácidos e apresenta meia-vida curta (10 minutos). Considerado como hormônio trófico; aquele que influencia indiretamente as células-alvo, estimulando primeiro outras glândulas endócrinas, o ACTH age na zona fasciculada e reticular, responsáveis

pela secreção dos glicocorticoides e andrógenos, respectivamente. O ACTH para exercer a ação final nas zonas citadas, liga-se nos receptores acoplados à proteína G nas membranas extracelulares, aumentando a produção do segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). O formação cAMP é uma caracterização peculiar do sistema endócrino, só é possível que pequenas doses hormonais sejam tão impactantes no organismo quando essa amplificação do sinal é formado. Isso é graças a ativação de uma molécula esteroideal ou proteica à um gene que é capaz de influenciar na formação de múltiplas moléculas mensageiras (KLEIN, 2014).

O cortisol endógeno ou exógeno providencia o *loop feedback* negativo inibindo o CRH e ACTH. Já fatores como estresse, processos inflamatórios, dor, trauma, hipóxia, hipoglicemia aguda, exposição ao frio e cirurgias, podem causar *feedback* positivo ao ACTH (FELDMAN et al., 2014).

Diferentemente dos humanos, o círculo circadiano não é bem definido nos cães variando muito durante o dia, já nos gatos parece haver um pico noturno, mas não significa que este ritmo circadiano possa levar a alterações clinicamente significativas. Os picos hormonais de CRH e ACTH são previstos ao longo do dia, mais eventualmente no final da tarde (BÓDIZS et al., 2020) .

4.1.3. Dopamina

A dopamina também participa desse estímulo hipotalâmico-hipofisário. A hipófise canina é dividida em parte anterior (adeno-hipófise), posterior (neurohipófise) e intermedia. Nessa última, a secreção do ACTH é inibida pela dopamina secretada no núcleo arqueado hipotalâmico, assim como pela serotonina e CRH (FELDMAN et al., 2014)

4.1.4. Cortex Adrenal

“The deeper you go, the sweeter you get” (ALLEN; SHARMA, 2020).

Os esteroides são produzidos a partir do colesterol por um par de glândulas conhecidas como adrenais ou suprarenais, referenciando a localização acima dos rins. O tamanho dessas glândulas variam conforme a raça e espécie estudada (CHOI; KIM; YOON, 2011; HOERAUF; REUSCH, 1999; MELIÁN et al., 2021). Histologicamente, a adrenal é dividida em três zonas. A glomerulosa é a camada

mais externa responsável pela produção dos mineralocorticoides. A zona fasciculada média sintetiza o cortisol e a camada mais interna, conhecida como zona reticular, produz os hormônios sexuais (androgênio e testosterona) (KLEIN, 2014).

A biossíntese dos esteroides depende das enzimas esteroidogênicas, a maioria delas pertencem à família da oxigenase do citocromo P450. Dependendo da deficiência enzimática ou a inserção da enzima na zona é que se sintetiza produtos diferentes. A síntese dos mineralocorticoides é possível pela presença da enzima aldosterona sintase, enquanto na zona fasciculada e reticular a presença da enzima 17 α -hidroxilase, ambas sintetizam 17 α -hidroxipregnenolona e 17 α -hidroxiprogesterona, precursores de cortisol e hormônios sexuais (FELDMAN et al., 2014).

4.2. Classificação e etiopatogenia do HC conforme a ALIVE

Atualmente a terminologia do HC e suas classificações segue as recomendações do projeto ALIVE. Dividiram a Síndrome de Cushing em ocorrência natural e iatrogênica. A primeira é subclassificada em ACTH-dependente e ACTH-independente. Enquanto a segunda, isto é, de consequência médica, é causada por administração excessiva de GC exógeno sistêmico ou tópico (EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ENDOCRINOLOGY, [s.d.]).

4.2.1. Ocorrência natural HCACTH-dependente

O hipercortisolismo por desregulação da secreção do ACTH pela pituitária (HCPD) geralmente é proveniente por neoplasia na pituitária ou hiperplasia. (EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ENDOCRINOLOGY, [s.d.]). Tumores de pituitária representam 80-85% dos casos de hipercortisolismo espontâneo em cães. Alguns estudos sugeriram que 70% desses tumores hipofisários sejam localizados na região pars distalis e a outra na pars intermediária. Quanto ao tamanho desses tumores, adotou-se as mesmas regras da medicina humana para as dimensões dos tumores hipofisários nos cães, podendo não ser coerente para algumas raças e tamanho. Considera-se microtumor menor que 10 mm no maior diâmetro e macrotumor maior que 10 mm no maior diâmetro. Embora os tumores adenomas invasivos e carcinomas sejam raros, os termos micro- ou macroadenomas são menos apropriados na ausência da análise histopatológica

(BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019a).

Outra forma dependente da produção adrenocorticotrófico e/ou precursores de ACTH ou CRH são tecidos com tumores neuroendócrinos. Os carcinoma pulmonar de células pequenas, carcinóides brônquicos, carcinóides pancreáticos, carcinóides tímicos e o feocromocitoma já foram relacionados por apresentarem estímulo adrenocorticotrófico, ou seja, ACTH- ectópico. Na medicina veterinária, o relato mais recente de Síndrome Cushing Ectópica (SCE) foi em um cão, da raça Scottish terrier, havia sinais clínicos de hipercortisolismo presente (poliúria, polidipsia, polifagia, abdômen abaulado e piodermatite recorrente) e presença de massa na adrenal esquerda vista no exame de ultrassonografia. Associado à sintomatologia clínica, ao alto nível de cortisol sérico, ao aumento das metanefrinas plasmático e ao aumento do ACTH endógeno, diagnosticou-se com SC e suspeitou-se concomitante com tumor de adrenal (TA) – em questão o feocromocitoma. Após a ressecção da massa da adrenal esquerda, a suspeita de feocromocitoma foi confirmada pelo histopatológico e com imunohistoquímica negativa para ACTH (LEE et al., 2020). Apesar de ser contraditório a imunomarcção, o presente caso explica que, como visto na medicina humana, pressupõe que o aumento do ACTH endógeno seja por um tumor secretor de CRH, esses são pequenos peptídeos derivados do ACTH e/ou precursores de ACTH com alto peso molecular indetectáveis pela reação antígeno-anticorpo (CASSARINO et al., 2012). Logo, consideram-se como o primeiro relato de caso de SCE associado ao feocromocitoma em cães (LEE et al., 2020). Segundo a ALIVE, considera-se HC ACTH ectópico quando há presença dos sinais clínicos frente a superexposição de glicocorticoide, falha na supressão do teste hormonal de baixa dose dexametasona, aumento marcante da concentração ACTH endógeno, aumento bilateral das simetrias das adrenais, imagem da pituitária dentro da normalidade e a identificação de um tumor não-pituitária e a resolução do excesso do ACTH, após a remoção dele (EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ENDOCRINOLOGY, [s.d.]).

Dentro da classificação ACTH-dependente, alguns casos se encontram com a síndrome clínica causada pelo excesso de ACTH, porém sem ser possível provar o aumento do cortisol sérico. Essa forma é conhecida como Síndrome de Cushing Subdiagnosticada e é caracterizada quando há presença de sinais clínicos de HC somado a exclusão de outras possibilidade que levariam a esses mesmos sinais

clínicos, normalização dos testes dinâmicos de função adrenais, dosagem de ACTH endógeno normal e exames de ultrassom sem evidências de tumor de adrenal secretor de GC (EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ENDOCRINOLOGY, [s.d.]).

4.2.2. Ocorrência natural HCACTH-independente

O hipercortisolismo, por origem de desregulação do cortisol pela córtex da adrenal, normalmente, é causado por um tumor ou hiperplasia de adrenal (HCAD) (EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ENDOCRINOLOGY, [s.d.]). A produção autônoma de excesso de cortisol por uma desordem da adrenal corresponde 15-20% dos casos de HC em cães. Como referido anteriormente, o cortisol realiza uma resposta, *feedback* ou retroalimentação, inibindo o estímulo de ACTH e CRH na pituitária e hipotálamo, respectivamente. Logo, pode resultar na atrofia contralateral da glândula adrenal e das células secretoras de cortisol não neoplásicas da glândula adrenal afetada (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019a).

Em cães, as glândulas mais afetadas por tumores endócrinos são as adrenais (BEATRICE et al., 2018). Os tumores de adrenais (TA) normalmente são malignos e os mais frequentes são os carcinomas e o feocromocitoma. Embora seja mais comum encontrar tumor em uma das adrenais, tumores bilateral de adrenais podem ocorrer e ainda serem de característica histopatológica diferente (ex. adenoma versus carcinoma, carcinoma versus feocromocitoma) (FELDMAN et al., 2014). Um estudo mostrou, por meio da avaliação ultrassonográfica e testes dinâmicos de função de adrenais, que 15 cães com HC ACTH-independente, 3 animais (20%) tinham tumores bilaterais (HOERAUF; REUSCH, 1999). Já outro estudo com 20 cães com tumores endócrino e/ou hiperplasia envolvendo duas glândulas evidenciou que; 14 cães tiveram alteração no córtex da adrenal, 50% tinham hiperplasia da adrenal (desses apenas 30% não eram bilaterais), 20% eram adenomas unilaterais, 15% eram carcinomas unilaterais e 35% eram feocromocitomas unilaterais. Logo, concluíram que 50% dos cães (10/20) com neoplasias endócrinas concomitantes apresentavam múltiplas lesões afetando as glândulas adrenais ou uma combinação de feocromocitoma ou tumores adrenocorticais com adenomas hipofisários (BEATRICE et al., 2018).

Quanto a patogenia do TA, ainda há muito o que se pesquisar (BENNAIM;

SHIEL; MOONEY, 2019a). Uma das habilidades dos hormônios é interagir com receptores ligantes na superfície da membrana ou intracelular, desenvolvendo a capacidade de modificar o funcionamento ou comportamento das células-alvo. Para tanto, a alta afinidade entre o receptor e o ligante (hormônio) ativa a cascata molecular no interior da célula, modificando a transcrição gênica para ter a resposta fisiológica final (ANTONINI; FRAGOSO; LACROIX, 2004).

No tecido normal adrenal, a esteroidogênese é sintetizada a partir da ligação do ACTH no seu receptor (ACTH-R), o qual é localizado nas células adrenocorticais. As proteínas G (GNAS) e quinase A (PKA) estão envolvidas no sistema do segundo mensageiro para o ACTH-R. A proteína reguladora aguda (StAR) permite a passagem do colesterol para dentro da mitocôndria, convertendo o colesterol em pregnenolona - uma ação que acontece por causa da ligação do ACTH. Logo, perceberam que alterações na expressão ou mutações no genes StAR, proteínas GNAS, PKA, ACTH-R e enzimas esteroidogênicas podem desempenhar um papel na patogênese tumoral de adrenais (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019b; FELDMAN et al., 2014).

Segundo a ALIVE, os critérios para o diagnóstico de HCAD seguem uma junção de informação como a presença da síndrome clínica de Cushing (exame físico, sinais clínicos, achados laboratoriais, testes dinâmicos de função das adrenais e exames de imagens – ultrassom, ressonância magnética ou tomografia computadorizada), demonstração de excesso de cortisol por meio de um teste dinâmico de função de adrenal (supressão com dexametasona baseado em sangue ou urina ou teste de estimulação com ACTH) e uso de testes para diferenciação do HCAD em relação ao HCPD (dosagem de ACTH endógeno ou mudanças morfológicas das adrenais observadas por exames de imagens) (EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ENDOCRINOLOGY, [s.d.]).

4.3. Epidemiologia

Estudos epidemiológicos em cães com HC enfatizaram alguns conceitos e outros passaram a ser novidades (O'NEILL et al., 2016). Sobre a prevalência ainda é incerta e muitas vezes são relatados casos em uma específica população. Um estudo estimou a prevalência de diagnóstico em cães com síndrome de Cushing no Reino Unido como 0,28%, sugerindo ser a terceira doença endócrina mais prevalente. Enquanto um estudo epidemiológico feito no Brasil, em

diferentes regiões do estado Rio Grande do Sul, mostrou que o HC foi a doença mais frequente nos cães, atingindo 37% da população estudada (523 casos) (PÖPPL et al., 2018).

Pode-se reafirmar que é uma doença que atinge cães de meia-idade. Até porque, por ser uma doença muitas vezes provocada por um câncer, sabe-se que o envelhecimento é um fator importante para mutações somáticas espontâneas (BENNAIM et al., 2019; KENNEDY; LOEB; HERR, 2012), logo, se explica a correlação da idade nessa endocrinopatia. A maioria dos cães com HCPD (>89%) e aqueles com TA funcionais-glicocorticoides apresentaram acima de 6 anos de idade (GALLELLI; CABRERA BLATTER; CASTILLO, 2010). Outro estudo mostrou que mais de 75% dos cães com HCPD tinham acima de 9 anos de idade e a média da idade foi de 8,6 até 11,7 anos (FELDMAN et al., 2014). Um estudo epidemiológico transversal analisou 304 cães com hipercortisolismo dentro de uma amostragem de 2535 cães atendidos no Reino Unido. A média encontrada da idade foi de 10,9 anos e, por meio da avaliação regressão logística multivariável, o avanço da idade foi associado com o aumento de chance de desenvolver hipercortisolismo; cães entre 9 a 11,9 anos mostraram 3,9 vezes (CI 95% 2,6 a 6,0) mais chances e cães acima ou igual a 12 anos mostraram 5,7 vezes (CI 95% 3,7 a 8,7) mais próximos do diagnóstico de hipercortisolismo quando comparados com os cães com a idade de 6 a 8,9 anos de idade (O'NEILL et al., 2016).

Quanto a predisposição do gênero, o HC é mais frequente em fêmeas. Um estudo com 1519 cães com HC (corresponde a 2-1% da população estudada de 70.574 cães falecidos), 57,47% eram fêmeas, 49,26% machos e 0,26% sexo indefinido. Neste mesmo estudo, mostrou-se que as fêmeas foram 1-4 vezes mais propensas a terem diagnóstico para HC comparado aos machos. O que se questiona é se os animais castrados e inteiros fazem diferença na frequência do surgimento do HC (HOFFMAN et al., 2018). Como um outro trabalho explicou, a testosterona inibe o ACTH e o cortisol em ratos in vivo, então, se o mesmo caminho fisiológico existir nos cães, a liberação da supressão pode contribuir para o HC em cães castrados (AJDŽANOVIĆ et al., 2015; O'NEILL et al., 2016).

Permanece a questão que não há diferença significativa entre cães de raças puras em comparação com mestiços em suas chances de desenvolver síndrome de Cushing. Um fato curioso é que para cada 1 em 40 cães da raça Standard

Dachshunds e 1 em 60 cães Bichon Frise havia diagnóstico para HC (O'NEILL et al., 2016). Isso impacta até mesmo na compreensão da etiopatogenia da doença em si, aonde a raça Dachshunds tem desenvolvimento do HC espontâneo de origem familiar, porém no Bichon Frise ainda não tinha sido questionado esse papel. As raças já relatadas com síndrome de Cushing em outras literaturas são Poodle, Standard Schnauzer, Fox Terrier, Boxers, Boston Terriers, Beagles e German Shepherd. As menos afetadas são Border collies e Labrador (BENNAIM et al., 2019; BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019a)

4.4. Manifestações clínicas do hipercortisolismo

Conforme o consenso do Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna (ACVIM), a investigação para HC é realizada na presença de um ou mais sinais clínicos e alteração laboratorial característico para a doença (BEHREND et al., 2013). Há muitos achados clínicos que podem ser encontrados em um paciente com Síndrome de Cushing (SC). As cinco mais prevalentes de acordo com alguns estudos são poliúria, polidipsia, polifagia, distensão abdominal e ofegação (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019a; JAFFEY et al., 2020).

Não existe apenas um mecanismo para se explicar a causa da poliúria (PU) e polidipsia (PD) no hipercortisolismo. Em teoria, o excesso do cortisol diminui a secreção do hormônio antidiurético vasopressina (ADH) sobre os receptores tubulares dos rins, resultando na diabetes insipidus central. Além disso, por causa da inapropriada resposta dos ductos coletores à vasopressina, também leva a uma condição de diabetes renal. Somado a esses fatores, os glicocorticoides aumentam a taxa de filtração glomerular e o transporte de sódio tubular, atraindo mais água, ocasionando o desequilíbrio hídrico seguido do aumento de ingestão de água de forma compensatória (BORIN-CRIVELLENTI; COSTA, 2021). Também um tumor hipofisário na região hipófise posterior, hipotálamo ou pedúnculo hipotalâmico pode ocasionar diabetes insipidus secundária à compressão tumoral. Ou, a diurese osmótica secundária à glicosúria, presente nos cães resistentes a insulina devido ao HC, é outro mecanismo fisiológico para PU/PD no HC (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019a).

Em um estudo recente, a polifagia (PF) marcou presença em 41.3% dos casos (222/537) (JAFFEY et al., 2020). Muitas vezes, esse achado não chama atenção do responsável, uma vez que para ele ter apetite elevado pode ser visto como

algo positivo. Entretanto, quando esse animal inicia com comportamentos estranhos como coprofragia, apetite depravado, ingestão de corpo estranho, ansiedade excessiva na hora de se alimentar (chora, vocaliza e/ou demonstra agressividade pela comida), desperta no responsável o interesse na investigação. Interessante saber que essa sintomatologia acontece pelos efeitos diretos orexígenos dos glicocorticoides endógenos, não ocorrendo frequentemente em humanos e gatos (FELDMAN et al., 2014).

A questão da distensão abdominal e da ofegação estão intimamente relacionadas com a hepatomegalia e fragilidade muscular. A relação dessas alterações clínicas citadas é decorrente ao excesso do cortisol causar múltiplas alterações metabólicas. Sendo essas a hepatopatia esteroideal originada pelo depósito de glicogênio, degradação muscular por causa da ação proteolítica do cortisol, distensão constante da bexiga (poliúria) e diminuição do tônus muscular. Todos favorecendo para um abdômen pendular (Figura 1) (YANOVSKI; CUTLER, 1994).

Alterações dermatológicas recorrentes tornam-se alertas para problemas endócrinos. Pelo opaco, alopecia (principalmente em flanco), pele fina, comedões, seborreia, piodermatite, flebectasia e calcinose cutânea compõem o atlas das lesões dermatológicas por exposição excessiva aos glicocorticoides (Figura 1). A calcinose cutânea, embora esteja relacionada a síndrome de Cushing, não se restringe apenas a doença endócrina. Essa alteração clínico-dermatológica se apresenta em inúmeras formas e coloração (Figura 1), variando em placas pequenas ou grandes, firmes ou ulceradas, brancas ou até rosadas, progredindo para ossificação dermal. A região de cabeça e tronco são as mais afetadas e, às vezes, têm infecção bacteriana secundária (ASHLEY; WILEY, 2020).

Disfunções respiratórias como dispneia, apneia e/ou síncope, podem ocorrer em pacientes cushingóides por causa de tromboembolismo pulmonar (TEP). Apesar de haver poucos relatos de TEP concomitante ao HC, quando ocorre, muitas vezes é fatal. A formação do tromboembolismo é explicada na relação dos corticosteroides poderem causar injúria endotelial, mudança na hipercoagulabilidade e na hemodinâmica da estase sanguínea ou turbulência, processo resumido no termo de tríade Virchow. Para formação dos coágulos, acredita-se que pelo menos 2 desses processos estão envolvidos. A hipercoagulabilidade desempenha um papel fundamental no processo de

coagulação, justamente por aumentar fatores procoagulantes (especialmente, fatores VIII, IX e Von Willebrand), pela deficiência da fibrinólise, aumentando o inibidor ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), levando ao encurtamento do tempo da atividade parcial tromboplastina (PTTa) e aumento da geração de trombina, o que traduz no maior risco de trombose (LI; STERN, 2019). O desenvolvimento da patogênese TEP na síndrome de Cushing ainda não está definida, mas os fatores considerados relevantes para tal formação são a eritrocitose, hipertensão, pancreatite concomitante, obesidade e a situação da hipercoagulabilidade. Um relato comprovou por necropsia o desenvolvimento de TEP fatal, ao identificar presença de um grande coágulo no ventrículo direito do coração de um cão jovem com HC iatrogênico, sendo essa apontada como a única causadora do coágulo (DORRESTEIN et al., 2019).

A hipertensão sistêmica (HS) - pressão sanguínea superior a 150mmHg, é bem reconhecida em cães com hipercortisolismo, especialmente a HS severa (≥ 180 mmHg) (BEHREND et al., 2013). A prevalência se assemelha entre humanos (70-85%) e cães (82%) (GARCÍA SAN JOSÉ et al., 2020; MANCINI et al., 2004; PIVONELLO et al., 2016). Apesar de não haver definição quanto a patofisiologia da HS em pacientes com SC, pressupõe-se que o aumento da atividade mineralocorticoide (GOY-THOLLOT et al., 2002; JAVADI et al., 2003), diminuição da concentração de óxido nítrico (VIDAL et al., 2018) ou o aumento da resistência vascular (CHEN; LIEN; HUANG, 2016; NOVELLAS; DE GOPEGUI; ESPADA, 2008) são alguns dos mecanismos envolvidos. Outro estudo identificou a trombocitose, baixa concentração de potássio sérico e proteinúria como potentes fatores de riscos para HS em cães com SC. Curiosamente e diferente do esperado, cães com diabetes e HC concomitante apresentaram pressão arterial sistólica menor (140mmHg) do que aqueles com apenas HC. Porém, como dito no presente trabalho, apenas 7 cães com diabetes foram inseridos. Logo, mais pesquisas incluindo um número maior de cães com ambas condições podem elucidar esse achado (GARCÍA SAN JOSÉ et al., 2020).

Embora incomum, distúrbios musculares são outras alterações associadas nos cães com SC (BEHREND et al., 2013). As miotonias são caracterizadas por contração ou relaxamento retardado do músculo após contração voluntária ou estimulada (VITE, 2002). Acredita-se que surgimento dessa alteração na SC não está relacionada diretamente com o excesso de cortisol, mas, talvez, na relação

da aldosterona. Dois casos com miopatia e HC concomitante foram acompanhados durante o tratamento com trilostano. Foi percebido que, apesar de tratar o hipercortisolismo com trilostano, os cães não melhoraram no quesito da miopatia. Presumindo-se que, mesmo que o fármaco seja um inibidor competitivo da 3 β hidroxisteroide desidrogenase (3 β -HSD), por dar o trilostano uma vez ao dia, não era o suficiente para controlar os níveis de alguns hormônios esteroidais (aldosterona e cortisol) (NAGATA; YUKI, 2015). A frequência da dosagem do trilostano é um debate nas miopatias em SC, porém um relato mostrou que os sinais miotônicos persistiram mesmo com aumento da frequência do fármaco para cada 12 horas e normalização dos valores do cortisol. Mas mesmo assim, por saber-se da dificuldade em controlar diariamente o nível do cortisol, concorda-se em ter mais pesquisas sobre a relação entre o cortisol e sinais miotônicos associados ao HC (NAM et al., 2020).

Outras comorbidades incomuns como ruptura de ligamento (0.33%) (HOFFMAN et al., 2018), paralisia do nervo facial (0.9%), anestro persistente (13.9%) e atrofia testicular (7%) são relatadas em pacientes com SC (MARTINS et al., 2019).

Figura 1. Exemplificação das diversas manifestações clínicas pela superexposição endógena de glicocorticoides de origem HCPD em diferentes cães atendidos no Serviço de Endocrinologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). **a)** Nota-se a presença de pontos de calcificação distrófica e a flebectasia abdominal; **b)** Retrata-se o abdômen de cão com pele fina e frágil; **c)** cão com aumento da distensão abdominal pela severa hepatomegalia e presença de estrias; **d)** e **e)** figuras diferentes que retratam de forma diversa a mesma característica dermatológica, a calcinose cutânea.



4.5. Alterações multissistêmicas causadas pelos glicocorticoides

4.5.1. Ação dos glicocorticoides no sistema hematológico

O hipercortisolismo causa várias alterações clinicopatológicas. A ausência ou presença destas não confirmam o excesso de cortisol sérico, mas a junção delas encaminha para a suspeita da doença hormonal adrenal (BEHREND et al., 2013).

No eritograma, o cortisol estimula direto a medula óssea influenciando nas linhagens celulares como a eritrocitose (9.5% - 17%) e trombocitose (37.9-78.6%). Além disso, o leucograma por estresse, caracterizado por monocitose (aproximadamente 30%), linfopenia (14-79.4%) e a eosinopenia (54-81.2%), pode estar presente no HC (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019b).

A superexposição ao glicocorticoide tem a capacidade de induzir a hepatopatia esteroide, bem como a gliconeogênese hepática e a diminuição do uso da glicose para os tecidos periféricos. Por isso, as enzimas hepáticas fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT) podem estar aumentadas em 76-100% e 80-95% dos casos, respectivamente. O aumento da FA torna-se uma suspeita indispensável para SC justamente pelo cortisol produzir uma isoenzima. A

hipercolesterolemia (73-90%), bem como a diminuição da concentração da ureia (34-56%) e a hiperglicemia (24-56%) são outros achados menos frequentes induzidos pelo excesso de cortisol endógeno (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019b).

4.5.2. Ação dos glicocorticoides no sistema renal

A hiperestenúria leve (1,013-1,025) ou isostenúria (1,008-1,012) podem ser encontradas em pacientes com HC. Os glicocorticoides também influenciam na imunidade corporal por causa dos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, por isso que, há predisposição de bacteriúria (10-50%), piúria, na população de HC e, por ação do cortisol na taxa de filtração tubular e glomerular dos rins, a proteinúria foi relatada em 62-80% dos casos (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019a; CARAGELASCO et al., 2017).

4.5.3. Alterações morfológicas no córtex da adrenal pelo hipercortisolismo

A respeito dos critérios para o diagnóstico de hipercortisolismo, além dos exames laboratoriais como hemograma, bioquímicos, urinálise, provas funcionais de adrenais, o exame ultrassonográfico serve como alicerce para a suspeita de HC (MELIÁN et al., 2021).

Têm sido publicados estudos sobre a mensuração da espessura das adrenais visualizadas por meio do ultrassom. Antigamente, acreditava-se em um limite superior normal de 0,74 cm para adrenal esquerda no plano transversal, independente do peso. Hoje, já se sabe que a espessura da adrenal tem uma boa correlação com o peso corpóreo do animal. Um estudo estabeleceu pontos de corte superiores para adrenal esquerda e direita no plano sagital de 0,54cm e 0,67cm, respectivamente, em Yorkshire terriers e 0,79cm e 0,95cm em Labradores (DE CHALUS et al., 2013). Outro estudo definiu adrenomegalia quando pelo menos uma adrenal era maior que 0,6cm para cães com menos de 10kg e superior a 0,75cm para aqueles com peso superior a 10kg (CHOI; KIM; YOON, 2011).

O plano transversal é considerado de maior acurácia do que o comprimento das adrenais. Um trabalho mensurou as adrenais de cães com HCPD, com peso médio de 32kg, mostrou que a esquerda e direita apresentava uma diâmetro

transversal médio de $0,63\text{cm} \pm 1,3$ e $0,65\text{cm} \pm 1,6$, respectivamente (FRANK et al., 2015).

O uso de limites superiores separados da espessura normal das glândulas adrenais esquerda e direita em cães saudáveis classificados nas quatro categorias de peso ($\geq 2,5\text{-}5\text{kg}$, $>5\text{-}10\text{kg}$, $>10\text{-}20\text{kg}$, $>20\text{-}40\text{kg}$) resultou em alta sensibilidade (95.6%) em detectar a adrenomegalia em cães com HC. E, de acordo com cada categoria de peso acima, a máxima espessura da adrenal esquerda e direita encontrada em cães com HC foi $0,76\text{cm}$ e $0,74\text{cm}$, $0,79\text{cm}$ e $0,82\text{cm}$, $0,91\text{cm}$ e $0,78\text{cm}$, $0,76\text{cm}$ e $1,09\text{cm}$, respectivamente (MELIÁN et al., 2021).

Apesar de considerar a ecografia como uma ferramenta diagnóstica útil para suspeitar e diferenciar a causa primária de HC, até por descartar outras doenças de origem não-adrenal e para apoiar uma suspeita clínica de desordem hormonal baseada nos achados ultrassonográficos (mucocoele, cálculos urinários, hepatopatia esteroideal) (MELIÁN et al., 2021), outro trabalho encontrou adrenomegalia em 4 de 7 cães com HCPD, significando que nem sempre a adrenomegalia está presente no HCPD (FRANK et al., 2015). A avaliação das adrenais não consiste apenas no tamanho, mas também na assimetria, destruição da arquitetura do tecido normal da adrenal e invasão de tecidos adjacentes (ex. veia cava) (BEHREND et al., 2013). Porém, a normalização de uma das glândulas adrenais e/ou dificuldade de detectar a atrofia da contralateral não excluem o HCAD. Sendo assim, a presença da adrenomegalia bilateral ou a ausência da atrofia contralateral da glândula ou até a normalização do tamanho das glândulas adrenais, não são suficientes para determinar isoladamente a ocorrência de um problema propriamente dito de SC, sendo primordial a associação de outros parâmetros (HOERAUF; REUSCH, 1999).

4.6. Testes específicos para diagnóstico de hipercortisolismo

Como o cortisol basal não tem valor diagnóstico para HC, testes laboratoriais funcionais das adrenais concluem o raciocínio clínico endócrino. Embora exista quatro formas laboratoriais para se pesquisar excesso de cortisol sérico ou diminuição da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ao *feedback* negativo do GC, nenhuma delas tem 100% de acurácia (BEHREND et al., 2013; NIVY et al., 2018).

O teste de supressão com baixa dose dexametasona (TSBD) é o teste ouro para diagnóstico de HC. Aplica-se a dexametasona (0,01mg/kg IV) e coleta-se sangue após 3-4 horas e 8 horas. Espera-se ter diminuição da sensibilidade do HHA ao *feedback* negativo do GC aplicado para os casos de funcionalidade normal das adrenais. É um teste de alta sensibilidade (99%-100%) e de especificidade variada (44%-95%), esta última em razão dos estudos terem diferentes grupos controles. A curva hormonal pode se apresentar em diferentes padrões: falha da supressão, supressão parcial, escape, padrão inverso e supressão completa. Lembrando-se que a literatura concorda em ser indicativo para HC os três primeiros padrões citados, enquanto padrões de supressão completa e inverso consideram-se ser pacientes normais (BENNAIM et al., 2018; BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019b).

O teste de estimulação com ACTH consiste na mensuração de cortisol basal e após 60-90 minutos da aplicação do hormônio tetracosactide (5 µg/kg IV ou 1 µg/kg IV). Mostra-se um teste característico para hipercortisolismo espontâneo quando o cortisol ultrapassa o valor de referência do laboratório. A sensibilidade do teste diferencia-se para tumores de adrenais funcionais (57%-63%) de pituitária-dependente (80%-83%). A especificidade é entre 59% e 93% e pela razão de sua especificidade, bem como não diferenciar TA de PD, preconiza-se o uso deste método laboratorial para hipoadrenocorticismo e hipercortisolismo iatrogênico (BEHREND et al., 2013).

A relação de cortisol-creatinina urinário é um método que apresenta viés no desempenho por sofrer interferência de fatores pré-analíticos (método de coleta e controle populacional) e analíticos (metodologia dos ensaios), por isso é indicado usá-la associado ao outro teste hormonal e para exclusão do SC. Estudos demonstram sensibilidade e especificidade de 75%-100% e 20%-25%, respectivamente (BEHREND et al., 2013).

Hipercortisolismo de origem de pituitária produz excesso de ACTH e, por esta razão, apresenta cortisol sérico alto. Em contrapartida, tumores de adrenais suprimem o ACTH pelo *feedback* negativo do GC. Logo, espera-se encontrar aumento do ACTH endógeno (ACTHe) nos casos de HCPD e diminuído nos TAs. No entanto, resultados duvidosos do ACTHe podem surgir, devido ser um hormônio extremamente instável, de difícil manejo de coleta e conservação criteriosa do material biológico (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019b).

5. Ação dos glicocorticoides no sistema gastrointestinal

Como mostrou-se nesta tese, o excesso de cortisol causa consequências em diferentes sistemas (tegumentar, vascular, hepático, hematológico, renal e entre outros). Por isso, os hormônios glicocorticoides são discutidos em vários contextos, inclusive gastrointestinal (FILARETOVA; PODVIGINA; YARUSHKINA, 2020).

Os glicocorticoides são associados como fatores de riscos para desenvolver gastrite, formação de úlcera péptica e sangramento gastrointestinal (ORAY et al., 2016). Mas, quando a superexposição de glicocorticoide é endógena, parecem ser raros os casos de gastrite ulcerativa. No entanto, a maioria das úlceras induzidas por esteroides é assintomática (YANOVSKI; CUTLER, 1994).

Surgiram estudos sobre os efeitos do cortisol endógeno na mucosa gastrointestinal mostrando uma função nos fatores de defesa (FILARETOVA et al., 2009). No entanto, esta relação ambígua, gastroproteção e ulcerogênica, dos GCs ainda não está esclarecida. Os Gcs exógenos, quando associados aos anti-inflamatórios não esteroidal (AINES), têm sido incriminados a causar graves lesões em mucosa gastrointestinal e disfunção plaquetária decorrente de inibição da ciclooxigenase (COX-1) e fosfolipase A2, levando ao aumento do tempo de sangramento gengival e outras anormalidades hemostáticas (NARITA et al., 2007). Como visto também em um estudo caso-controle, pacientes expostos aos GCs e AINES tiveram 5 vezes mais chances de terem sangramento de úlcera péptica do que pacientes que não usaram ambas as medicações. Quanto aqueles que usaram apenas os GCs apresentaram risco moderado às lesões gastrintestinais (REINAU et al., 2018).

Outro estudo sobre a defesa da barreira gástrica mostrou correlação negativa entre baixo nível de cortisol e a bactéria *Helicobacter pylori* em humanos, concluindo que, os GCs endógeno interferem em um dos mecanismos de defesa do hospedeiro, auxiliando na prevenção da bactéria. No entanto, requer-se mais estudos sobre se o cortisol endógeno afeta apenas os mecanismos de defesa do hospedeiro ou também os fatores bacterianos (KOŞAN et al., 2008).

A esteatose hepática esteroide, perfurações viscerais e pancreatites são outras complicações gastrintestinais provocadas pelos GCs exógenos (ORAY et al., 2016). Quanto à pancreatite, não se sabe ao certo sobre o mecanismo do

esteróide oral influenciar, no entanto, aumentou duas vezes a chance de desenvolvê-la quando comparou-se com aqueles que não usaram os GCs orais (SADR-AZODI et al., 2013). Além disso, quando associa-se a pancreatite e o hipercortisolismo espontâneo, cães com pancreatite apresentaram maiores chances de ter HC do que aqueles cães que não tinham a pancreatite. Portanto, o risco em desenvolver a pancreatite por causa de GCs, seja endógeno ou exógeno, é maior do que quando não exposto aos GCs (KIM et al., 2019).

Ainda sobre a relação do cortisol e ação dele no sistema gastrointestinal, em humanos, seis pacientes com hipercortisolismo endógeno de diferente causalidade foram diagnosticados com perfuração intestinal. Similar aos casos que usam GCs exógenos, pacientes com HC endógeno têm alto risco de perfuração intestinal, especialmente diverticular e deve ser monitorado de perto para evitar intervenções cirúrgicas (SHAHIDI; PHILLIPS; CHIK, 2019).

6. Métodos de detecção de sangramento gastrointestinal (SGI)

As manifestações de SGI são retratadas por duas formas: a oculta e a hemorrágica. A forma oculta é quando a quantidade de perda de sangue intestinal é pequena para ter uma repercussão clínica, podendo ter ou não deficiência de ferro e é detectada mais de uma vez por testes de pesquisa de sangue oculto fecal (TSOF). A hemorrágica apresenta manifestação clínica (melena e/ou hematoquezia) recorrente ou persistente após exames endoscópicos negativos (LIN; ROCKEY, 2005) .

Em humanos, a pesquisa de sangue oculto fecal é eleita para triagem de rastreamento de câncer de colorretal devido ao seu custo-efetividade e não-invasividade (BENTON; SEAMAN; HALLORAN, 2015). Diferentes ensaios de TSOF foram desenvolvidos para humanos. Estes incluem testes cromogênicos, ensaios de base imunoquímica e heme-porfirina. Os cromogênicos são exemplificados por testes baseados no guáico (detecta o componente heme da hemoglobina) e no reagente O-tolidina (um derivado da benzidina). O imunoquímico é o teste imunológico imuno-histoquímica fecal (FIT) (detecta o componente globina da hemoglobina) e ensaio heme-porfirina baseia-se no espectrofluorímetro (detecta o componente heme da hemoglobina). Todos têm sensibilidades suficientes para detectar sangue não visível nas fezes (MITCHELL; SCHAEFER; DUBAGUNTA, 2004).

O teste químico pelo método guáiac, de acordo com Greigor, é capaz de detectar hemoglobina não-específica nas fezes devido a reação pseudo-peroxidase. A hemoglobina, pelo contato com o guáiac, sofre oxidação de um composto fenólico (ácido alfa-guaiacônico) pela ação do peróxido de hidrogênio da solução desenvolvedora, resultando no teste a formação de quinona colorida, ou seja, um halo azul visível macroscopicamente (OBSCREEN, 2021).

A vantagem do guáiac é conhecida pela sua facilidade de execução, não precisando de condições especiais para transportar o kit guáiac e nem de aparelhos laboratoriais sofisticados. No entanto, existem algumas desvantagens do TSOE guáiac. Tanto as recomendações do fabricante quanto evidências científicas alertam sobre interferências pré-analíticas na confiabilidade do resultado deste teste. A dieta é um dos cuidados prévios a ser adotada, normalmente recomenda-se não ingerir proteínas de carne vermelha, certas frutas e legumes por 72 horas antes e durante o teste de sangue oculto fecal. Alimentos como carnes cruas ou meio cozida e carne fria (*steak*, salame, fígado e morcela) bem como vegetais que contém alta atividade peroxidase (legumes como nabo, brócolis, couve-flor, rabanetes, melões, pepinos, pastinaca) podem resultar em falso-positivos. Outra recomendação é a respeito do uso de alimentos de boas fontes de fibras para facilitar o trânsito gastrointestinal (MITCHELL; SCHAEFER; DUBAGUNTA, 2004).

Medicações como ácido acetilsalicílico, fenilbutazona, indometacina, reserpina, corticosteroides e AINES também influenciam no teste guáiac. O uso da vitamina C, ácido ascórbico, inibe a oxidação do guáiac, podendo resultar em falso-negativos. A amostra é estável à temperatura ambiente e deve ser testado no prazo até 14 dias após a coleta (OBSCREEN, 2021; PIERINI et al., 2020; RABENECK et al., 2008).

As marcas comercializadas de TSOE guáiac são Hemocult II, Hemocult II SENSE, Feca-cult® e, atualmente, está disponível no mercado o teste Hexagon OScreen® (MITCHELL; SCHAEFER; DUBAGUNTA, 2004; OBSCREEN, 2021). É um teste laboratorial subjetivo, não automatizado e promove um resultado qualitativo (positivo ou negativo) (BENTON; SEAMAN; HALLORAN, 2015).

O teste benzidina é conhecido desde a década de 70, pela ciência forense, como reagente para vestígios de sangue nos elementos investigados. Baseia-se na reação química do composto tetrametilbenzidina com peróxido de hidrogênio,

este, por sua vez, oxida o composto citado, alterando a estrutura bioquímica e, em razão disso, altera-se a cor para azul (TUFFLI; GASCHEN; NEIGER, 2001). Visualmente, percebe-se que é um teste de coloração forte e facilmente reativo, ou seja, detecta pequenas quantidades de sangue, mas também, pode reagir com reações peroxidase de alimentos e levar a ter falso-positivos. Apesar disso, as maiores desvantagens para evitar o uso deste reagente são atribuídas aos outros elementos como as propriedades cancerígenas, a difícil aquisição do ácido acético puro (usado para diluir a benzidina) e, este é controlado pela Polícia Federal e pelo Exército (Lei nº 10.357, de 27 de dezembro de 2001) e a necessidade de preparação de todos os reagentes e soluções para realização do teste (fracionamento, pesagem e dissolução da tetrametilbenzidina para a preparação da solução acética 50%) (SYED; KHATOON; SILWADI, 2001).

O teste imonohistoquímico fecal (FIT) pesquisa sangue nas fezes por meio de anticorpos direcionados contra a hemoglobina intacta específica-humana, ou seja, hemoglobina não-digerida nas fezes. Por isso, não é indicado para sangramentos de trato gastrointestinal superior e menos ainda para hemoglobinas de outras espécies, ao menos que haja uma reatividade cruzada comprovada com a hemoglobina animal em questão (<https://eclinpath.com/chemistry/iron-metabolism/fecal-occult-blood/>). A leitura positiva no teste FIT ocorre na presença do complexo antianticorpo-globina, porém, o TSO FIT qualitativo apresenta diferentes sensibilidades para diferentes kits FIT, o que culmina com um resultado oposto para uma mesma amostra testada pelos diferentes kits (BENTON; SEAMAN; HALLORAN, 2015).

As vantagens do teste FIT relacionam-se ao desempenho específico e por detectar especificamente globina da espécie humana. É por esse motivo que é incomum ter falsos resultados por uso de dietas à base carne vermelha ou qualquer reação peroxidase dietética. Já as desvantagens são a disponibilidade limitada e a demanda do tempo laboratorial (MITCHELL; SCHAEFER; DUBAGUNTA, 2004). Embora seja mais caro que o TSO guáico, apresenta melhor sensibilidade comparado a ele (BENTON; SEAMAN; HALLORAN, 2015).

Visto que existem testes imunológicos para pesquisar especificamente a hemoglobina humana em amostras fecais, os testes químicos na medicina veterinária continuam sendo utilizados, porque ainda os testes para detecção de hemoglobina canina específica fecal não foram desenvolvidos e aplicados. Há

uma experiência descrita usando a técnica aglutinação em látex indireto com anticorpos anti-hemoglobina canina, mostrando que o teste tinha boa especificidade para a presença de hemoglobina canina oculto nas fezes (JINBO et al., 1997). No entanto, sua utilização na prática clínica ainda é limitada uma vez que este ensaio não está disponível comercialmente (STILLER, 2020).

Teste heme-porfirina, nome comercial Hemoquant®, mensura derivados da hemoglobina porfirina, permitindo a medição quantitativa da hemoglobina fecal. Seu uso é limitado porque tem trabalhos relatando alto índice de falsos-positivos, além do alto custo do teste e demanda de tempo no laboratório. Este teste não é validado para cães e pelo fato da mioglobina interferir na heme-porfina, dietas à base de carne podem resultar em falsos-positivos, decaindo a especificidade do teste (ROCKEY; AUSLÄNDER; GREENBERG, 1999).

Independente da escolha do TSOE, quanto ao procedimento de coleta, como não se sabe se o toque retal poderia resultar microfissuras ao ponto de causar um falso-positivo, é orientado ao paciente que seja por defecação espontânea a confecção dos cartões dos TSOE, seguindo as recomendações de dieta prévias ao teste (MITCHELL; SCHAEFER; DUBAGUNTA, 2004).

7. Pesquisas que investigaram sangue oculto fecal (SOF) na medicina veterinária

Na medicina, os sangramentos gastrintestinais (SGI) são causas de importantes doenças de ordem superior (gastrite, lesões vasculares, úlcera esofágica, doença pancreática e entre outras), de ordem inferior (doença diverticular, cânceres gastrintestinais, doença intestinal inflamatória, colites, pólipos) e alterações hemodinâmicas (coagulopatias, diabetes *mellitus*, doença renal crônica etc.). Além disso, o SGI oculto tornar-se um parâmetro importante para diagnóstico precoce de câncer de colorretal e microangiopatia por causa de diabetes *mellitus* (CHOI et al., 2015; NABLE; GRAHAM, 2016; NAKAJIMA; SUWA, 2017).

Observando-se a importância e a aplicabilidade dos testes SOF em humanos, estudos surgem na medicina veterinária abrindo horizontes para os TSOE. Um estudo a respeito da sensibilidade analítica do TSOE determinou boa sensibilidade do TSOE guáico, quando se adicionou à dieta concentrações igual

ou superior a 15mg/kg de hemoglobina. No entanto, na concentração abaixo de 1,5mg/kg hemoglobina, o TSOF guáico acusou como positivo em um dos animais. Similar aos felinos, os cães precisaram de concentração de 20mg/kg de hemoglobina para determinar um resultado preciso no TSOF (RUDINSKY; GUILLAUMIN; GILOR, 2017). No presente estudo, percebeu-se que 1mg de hemoglobina/grama fezes foi suficiente para serem determinadas amostras positivas por ambos os testes colorimétricos (benzidina e guáico) e, em todas as amostras com 40mg de hemoglobina/grama fezes foram consideradas verdadeiramente positivas, por todos os avaliadores, para ambos os testes SOF.

A pesquisa de SOF foi aplicada na especialidade de nefrologia veterinária, quando se avaliou nos cães doentes renais crônicos (DRC), a perda de sangue oculta nas fezes pelo teste químico benzidina. Cães com DRC, na fase mais avançada, tiveram maior incidência de SOF do que o grupo controle. Enquanto, na fase inicial da DRC, 80% dos cães não mostraram anemia e, 90% desses, tinham TSOF positivos. Portanto, o SOG é um achado clínico comum nos DRC e acredita-se que o tratamento para a perda SOF pode diminuir a taxa de morbidade e aumentar a expectativa do tempo de vida dos pacientes com DRC (CRIVELLENTI et al., 2017).

Mais recentemente, um trabalho mostrou o efeito da dieta e a capacidade do TSOF guáico em identificar o sangue nas fezes de cães saudáveis após administração oral de sangue do próprio animal. Este trabalho não só trouxe respostas sobre a não influência de duas dietas testadas da mesma marca Purina® (hipoalergênica hidrolisada de soja e gastrointestinal hidrolisado de víscera de aves) na positividade do TSOF, mas como também respondeu sobre a influência de quantidade de sangue adicionada para se obter a positividade verdadeira no TSOF guáico. A concentração de 40 mg_{Hgb}/kg identificou mais TSOF verdadeiros positivos do que outras concentrações e, a diluição a partir de 6,5 µg_{Hgb}/mL, foi o suficiente para identificar positivos no SOF guáico (PIERINI et al., 2020).

Portanto, ao notar as diversas aplicabilidades dos TSOF, hipotetizou-se que o excesso de cortisol endógeno poderia levar aos mesmos danos teciduais e/ou vasculares causados pela administração exógena de glicocorticoides, podendo ter um SGI oculto nas fezes de cães com HC. Por isso, este trabalho objetivou

pesquisar sangramento gastrointestinal oculto fecal em cães com hipercortisolismo, utilizando o teste guáico como a técnica de escolha para este fim.

Referências bibliográficas

- AJDŽANOVIĆ, V. et al. Testosterone application decreases the capacity for ACTH and corticosterone secretion in a rat model of the andropause. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 6, p. 528–535, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.04.002>
- ALLEN, M. J.; SHARMA, S. **Physiology, Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH)**. Lincoln Memorial University-DeBusk College of Osteopathic: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2020.
- ANTONINI, S. R.; FRAGOSO, M. C.; LACROIX, A. Clinical and molecular aspects of the ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 48, n. 5, p. 620–636, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302004000500006>
- ASHLEY, P.; WILEY, J. Endocrine skin diseases. 2020. <https://doi.org/10.1002/9781119226338.ch12>
- BEATRICE, L. et al. Concurrent endocrine neoplasias in dogs and cats: a retrospective study (2004-2014). **The Veterinary record**, v. 182, n. 11, p. 323, 2018. <https://doi.org/10.1136/vr.104199>
- BEHREND, E. N. et al. Consensus Statement: Canine Hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. Table 1, p. 1292–1304, 2013. <https://doi.org/10.1111/jvim.12192>
- BENNAIM, M. et al. Evaluation of individual low-dose dexamethasone suppression test patterns in naturally occurring hyperadrenocorticism in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 3, p. 967–977, 2018. <https://doi.org/10.1111/jvim.15079>
- BENNAIM, M. et al. Clinical and Clinicopathological Features in Dogs with Uncomplicated Spontaneous Hyperadrenocorticism Diagnosed in Primary Care Practice (2013–2014). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 55, n. 4, p. 178–186, 2019. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6789>
- BENNAIM, M.; SHIEL, R. E.; MOONEY, C. T. Diagnosis of spontaneous hyperadrenocorticism in dogs. Part 1: Pathophysiology, aetiology, clinical and clinicopathological features. **Veterinary Journal**, v. 252, p. 105342, 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105342>
- BENNAIM, M.; SHIEL, R. E.; MOONEY, C. T. Diagnosis of spontaneous hyperadrenocorticism in dogs. Part 2: Adrenal function testing and differentiating tests. **Veterinary Journal**, v. 252, p. 105343, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105343>
- BENTON, S. C.; SEAMAN, H. E.; HALLORAN, S. P. Faecal Occult Blood Testing for Colorectal Cancer Screening: the Past or the Future. **Current Gastroenterology Reports**, v. 17, n. 2, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11894-015-0428-2>
- BÓDIZS, R. et al. Sleep in the dog: comparative, behavioral and translational relevance. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 33, p. 25–33, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2019.12.006>
- BORIN-CRIVELLENTI, Sofia; COSTA, Paula Barbosa. Testes diagnósticos: interação endócrino-renal. In: CRIVELLENTI, Leandro Z.; GIOVANINNI, Luciano H.. **Tratado de Nefrologia e Urologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Medvet, 2021. Cap. 6. p. 3-782.
- CARAGELASCO, D. S. et al. Urine protein electrophoresis study in dogs with

pituitary dependent hyperadrenocorticism during therapy with trilostane. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 734–740, 2017. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000700014>

CASSARINO, M. F. et al. ACTH-secreting pheochromocytoma with false-negative ACTH immunohistochemistry. **Endocrine Pathology**, v. 23, n. 3, p. 191–195, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12022-012-9212-0>

CHEN, H. Y.; LIEN, Y. H.; HUANG, H. P. Association of Renal Resistive Index, Renal Pulsatility Index, Systemic Hypertension, and Albuminuria with Survival in Dogs with Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism. **International Journal of Endocrinology**, v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3814034>

CHOI, J.; KIM, H.; YOON, J. Ultrasonographic adrenal gland measurements in clinically normal small breed dogs and comparison with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 8, p. 985–989, 2011. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0479>

CHOI, Y. A. et al. Diagnostic utility of immunochemical fecal occult blood tests to detect lower gastrointestinal lesions in patients with chronic kidney disease. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 30, n. 7, p. 919–925, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00384-015-2200-3>

CRIVELLENTI, L. Z. et al. Occult gastrointestinal bleeding is a common finding in dogs with chronic kidney disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 46, n. 1, p. 132–137, 2017. <https://doi.org/10.1111/vcp.12461>

DE CHALUS, T. et al. Ultrasonographic Adrenal Gland Measurements in Healthy Yorkshire Terriers and Labrador Retrievers. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v. 42, n. 1, p. 57–64, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2012.01165.x>

DORRESTEIN, E. et al. Fatal pulmonary thromboembolism in a two-year-old dog receiving long-term corticosteroid therapy. **Veterinary Record Case Reports**, v. 7, n. 2, p. 1–4, 2019. <https://doi.org/10.1136/vetreccr-2018-000701>

EUROPEAN SOCIETY OF VETERINARY ENDOCRINOLOGY. **ESVE**. Disponível em: <<https://www.esve.org/alive/search.aspx>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

FELDMAN, E. et al. **Canine and Feline Endocrinology**. 4. ed. [s.l.: s.n.].

FILARETOVA, L. et al. Dual action of glucocorticoid hormones on the gastric mucosa: How the gastroprotective action can be transformed to the ulcerogenic one. **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 15–22, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10787-008-8046-3>

FILARETOVA, L.; PODVIGINA, T.; YARUSHKINA, N. Physiological and Pharmacological Effects of Glucocorticoids on the Gastrointestinal Tract. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 25, p. 2962–2970, 2020. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200521142746>

FRANK, L. A. et al. Serum cortisol concentrations in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism and atypical hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 1, p. 193–199, 2015. <https://doi.org/10.1111/jvim.12500>

GALLELLI, M. F.; CABRERA BLATTER, M. F.; CASTILLO, V. A comparative study by age and gender of the pituitary adenoma and ACTH and α -MSH secretion in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 33–40, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.06.011>

GARCÍA SAN JOSÉ, P. et al. Prevalence and risk factors associated with systemic hypertension in dogs with spontaneous hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 5, p. 1768–1778, 2020. <https://doi.org/10.1111/jvim.15841>

GOY-THOLLOT, I. et al. Investigation of the role of aldosterone in hypertension associated with spontaneous pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs.

Journal of Small Animal Practice, v. 43, n. 11, p. 489–492, 2002.

<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00019.x>

HOERAUF, A.; REUSCH, C. Ultrasonographic Characteristics of Both Adrenal Glands in 15 Dogs with Functional Adrenocortical Tumors. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 3, p. 193–199, 1999.

<https://doi.org/10.5326/15473317-35-3-193>

HOFFMAN, J. M. et al. Canine hyperadrenocorticism associations with signalment, elected comorbidities and mortality within North American veterinary teaching hospitals. **Journal of Small Animal Practice**, v. 59, n. 11, p. 681–690, 2018.

<https://doi.org/10.1111/jsap.12904>

INDA, C. et al. Endocrinology and the brain: Corticotropin-releasing hormone signaling. **Endocrine Connections**, v. 6, n. 6, p. R99–R120, 2017.

<https://doi.org/10.1530/EC-17-0111>

JAFFEY, J. A. et al. Diagnostic contribution of individual components of adrenal function tests to diagnose canine hyperadrenocorticism. **Veterinary Journal**, v. 263, p. 105520, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105520>

JAVADI, S. et al. Plasma aldosterone concentrations and plasma renin activity in healthy dogs and dogs with hyperadrenocorticism. **Veterinary Record**, v. 153, n. 17, p. 521–525, 2003. <https://doi.org/10.1136/vr.153.17.521>

JINBO, T. et al. Experimental detection of canine haemoglobin (occult blood) in canine faeces by reversed passive latex agglutination. **Veterinary Research Communications**, v. 21, n. 5, p. 347–353, 1997.

<https://doi.org/10.1023/A:1005812304532>

KENNEDY, S. R.; LOEB, L. A.; HERR, A. J. Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 133, n. 4, p. 118–126, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.10.009>

KIM, H. et al. Evaluation of Hypertriglyceridemia as a Mediator Between Endocrine Diseases and Pancreatitis in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 55, n. 2, p. 92–100, 2019. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6791>

KLEIN, B. G. Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária. **Elsevier**, p. 1599, 2014.

KOŞAN, B. et al. Role of endogenous cortisol on Helicobacter pylori colonization. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10–11, p. 917–919, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.03.004>

LEE, S. et al. Ectopic Cushing's syndrome associated with a pheochromocytoma in a dog: A case report. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2020.

<https://doi.org/10.1186/s12917-020-2244-7>

LI, R.; STERN, J. A. Pulmonary thromboembolism. In: **Textbook of Small Animal Emergency Medicine**. [s.l: s.n.]. v. 12p. 5155–5160.

LIN, S.; ROCKEY, D. C. Obscure gastrointestinal bleeding. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 34, n. 4, p. 679–698, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.gtc.2005.08.005>

MANCINI, T. et al. High cardiovascular risk in patients with Cushing's syndrome according to 1999 WHO/ISH guidelines. **Clinical Endocrinology**, v. 61, n. 6, p. 768–777, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02168.x>

MARTINS, F. S. M. et al. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects in a case series of canine hyperadrenocorticism: 115 cases (2010-2014)1. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 900–908, 2019. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6105>

MELIÁN, C. et al. Ultrasound evaluation of adrenal gland size in clinically healthy dogs and in dogs with hyperadrenocorticism. **Veterinary Record**, v. 188, n. 8, p. no, 2021. <https://doi.org/10.1002/vetr.80>

MITCHELL, S. H.; SCHAEFER, D. C.; DUBAGUNTA, S. A New View of Occult and Obscure Gastrointestinal Bleeding. **American Family Physician**, v. 69, n. 4, p. 875–881, 2004.

NABLE, J. V.; GRAHAM, A. C. Gastrointestinal Bleeding. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 309–325, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2015.12.001>

NAGATA, N.; YUKI, M. Long-term outcome of myotonia associated with hyperadrenocorticism in 2 dogs. **Canadian Veterinary Journal**, v. 56, n. 9, p. 931–933, 2015.

NAKAJIMA, K.; SUWA, K. Association between positive fecal occult blood test and diabetes in a population undergoing health screening. **Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 1–2, p. 97–100, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.10.005>

NAM, S. et al. Long-term follow up of refractory myotonia associated with hyperadrenocorticism in a maltese dog. **Journal of Veterinary Clinics**, v. 37, n. 5, p. 273–277, 2020. <https://doi.org/10.17555/jvc.2020.10.37.5.273>

NARITA, T. et al. The interaction between orally administered non-steroidal anti-inflammatory drugs and prednisolone in healthy dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 4, p. 353–363, 2007. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.353>

NIVY, R. et al. The interpretive contribution of the baseline serum cortisol concentration of the ACTH stimulation test in the diagnosis of pituitary dependent hyperadrenocorticism in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1897–1902, 2018. <https://doi.org/10.1111/jvim.15330>

NOVELLAS, R.; DE GOPEGUI, R. R.; ESPADA, Y. Increased renal vascular resistance in dogs with hepatic disease. **Veterinary Journal**, v. 178, n. 2, p. 257–262, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.026>

O'NEILL, D. G. et al. Epidemiology of hyperadrenocorticism among 210,824 dogs attending primary-care veterinary practices in the UK from 2009 to 2014. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 7, p. 365–373, 2016. <https://doi.org/10.1111/jsap.12523>

OBSCREEN, H. **HEXAGON OBScreen**. Disponível em: <https://invitro.com.br/wp-content/uploads/2021/12/hexagon_obscreen.pdf>.

ORAY, M. et al. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 15, n. 4, p. 457–465, 2016. <https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1140743>

PIERINI, A. et al. The guaiac-based fecal occult blood test in healthy dogs: Evaluation of the effects of diet, and the ability of the test to detect fecal occult blood. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 49, n. 1, p. 71–77, 2020. <https://doi.org/10.1111/vcp.12829>

PIVONELLO, R. et al. Complications of Cushing's syndrome: State of the art. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 4, n. 7, p. 611–629, 2016. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)00086-3)

PÖPPL, Á. G. et al. Frequency of endocrinopathies and characteristics of affected dogs and cats in Southern Brazil (2004-2014). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81099>

RABENECK, L. et al. Cancer Care Ontario guaiac fecal occult blood test (FOBT) laboratory standards: Evidentiary base and recommendations. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 16–17, p. 1289–1305, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.08.069>

REINAU, D. et al. Glucocorticoids and the Risk of Peptic Ulcer Bleeding: Case–Control Analysis Based on Swiss Claims Data. **Drug Safety**, v. 41, n. 7, p. 725–730, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0645-3>

ROCKEY, D. C.; AUSLÄNDER, A.; GREENBERG, P. D. Detection of upper gastrointestinal blood with fecal occult blood tests. **American Journal of**

Gastroenterology, v. 94, n. 2, p. 344–350, 1999. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.855_r.x

RUDINSKY, A. J.; GUILLAUMIN, J.; GILOR, C. Sensitivity of fecal occult blood testing in the cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 6, p. 603–608, 2017. <https://doi.org/10.1177/1098612X16643752>

SADR-AZODI, O. et al. Association of oral glucocorticoid use with an increased risk of acute pancreatitis: A population-based nested case-control study. **JAMA Internal Medicine**, v. 173, n. 6, p. 444–449, 2013. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.2737>

SHAHIDI, M.; PHILLIPS, R. A.; CHIK, C. L. Intestinal Perforation in ACTH-Dependent Cushing's Syndrome. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9721781>

STILLER, Jenny. **Evaluation of BUN/creatinine ratio and video capsule endoscopy in diagnosing gastrointestinal bleeding in dogs**. 2020. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, The University Of Guelph, Canada, 2020.

SYED, A. A.; KHATOON, B. A.; SILWADI, M. F. New reagents for detection of faecal occult blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 581–586, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00454-4](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00454-4)

TUFFLI, S. P.; GASCHEN, F.; NEIGER, R. Effect of dietary factors on the detection of fecal occult blood in cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 2, p. 177–179, 2001. <https://doi.org/10.1177/104063870101300218>

VIDAL, P. N. et al. Decrease of nitric oxide and increase in diastolic blood pressure are two events that affect renal function in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. **Open Veterinary Journal**, v. 8, n. 1, p. 86–95, 2018. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.14>

VITE, C. H. Myotonia and disorders of altered muscle cell membrane excitability. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 32, n. 1, p. 169–187, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00084-6)

YANOVSKI, J. A.; CUTLER, G. B. Glucocorticoid Action And The Clinical Features Of Cushing's Syndrome. **Endocrinology and metabolism clinic of North America**, v. 23, n. 3, p. 487–509, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(18\)30080-X](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(18)30080-X)

CAPÍTULO II – IN VITRO PERFORMANCE EVALUATION OF A COMMERCIAL GUAIAAC BASED FECAL BLOOD OCCULT TEST FOR DOGS

Artigo a ser publicado na revista Veterinary Clinical Pathology

IN VITRO PERFORMANCE EVALUATION OF A COMMERCIAL GUAIAAC BASED
FECAL BLOOD OCCULT TEST FOR DOGS

Paula Barbosa Costa¹; Geovana Alves Justino Silva²; Alef Winter Oliveira Alvarenga³;
Thais Miranda Migliorini⁴; Nathan da Rocha Neves Cruz⁵; Natascha Almeida Marques da
Silva⁴; Leandro Zuccolotto Crivellenti¹; Fernanda Nastri Gouvêa¹; Luana Oliveira Branco¹;
Hévila Dutra Barbosa de Cerqueira¹; Sofia Borin-Crivellenti^{1*}

¹ Graduate Program in Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

² Practicing Veterinary Clinician, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

³ Clinical Veterinary Pathologist, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

⁴ College of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

⁵ School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: Sofia Borin Crivellenti, College of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, Mato Grosso Avenue, 3289, 38405-314, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: sofiabcrivellenti@ufu.br.

RESUMO

Sangramentos gastrointestinais (GI) podem manifestar de forma oculta. A importância da detecção precoce do sangue oculto fecal (SOF), somado à praticidade e disponibilidade dos kits laboratoriais atualmente disponíveis no mercado, são as razões que regem a necessidade da implantação dos testes SOF na rotina clínica veterinária. Este trabalho teve como objetivo investigar a sensibilidade analítica dos testes sangue oculto fecal guáiac (SOFg) e benzidina (SOFb) em cães saudáveis. Essas amostras fecais serviram como controle negativo (*in natura*) e positivo, esse último aconteceu quando sangue total do mesmo animal foi adicionado intencionalmente às amostras fecais para obter 1, 5, 10, 20 e 40 miligramas de hemoglobina/g fezes (Hb/g). Amostras fecais contendo as concentrações conhecidas de Hb/g foram avaliadas de acordo com dois testes e em método duplo-cego por três patologistas clínicos. A força de concordância entre os avaliadores foi significativa ($p < 0,0001$) e moderada ($p < 0,90$), a moda dos resultados dos testes foi comparada entre si considerando a presença (ausência) de sangue em cada amostra analisada e também sua classificação de intensidade (fracamente, moderadamente, fortemente) quando positivo. Nas amostras forjadas com sangue em

concentração pré-determinada, foi detectada presença de sangue oculto a partir de 1mg de Hb/g fezes e nenhuma amostra com concentração de 40mg Hb/g fezes obteve classificação “negativa” ou “fracamente positiva”. O teste SOFg teve melhor desempenho individual em todos os quesitos analisados, incluindo de sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo, razões de verossimilhanças positiva e negativa, acurácia e praticidade na execução do teste.

Palavras-chaves: canino, fezes, sangue oculto, teste fecal

ABSTRACT

Gastrointestinal (GI) bleeding may be occult to the naked eye. The importance of early detection of fecal occult blood (FOB), added to the feasibility and availability of laboratory kits currently available on the market, are the reasons that govern the need to implement fecal occult blood (FOB) tests in the veterinary clinical routine. This work aimed to investigate the analytical sensitivity of the guaiac fecal occult blood test (gFOBT) and benzidine (bFOBT) in healthy dogs. Fecal samples obtained by spontaneous defecation were obtained from 6 clinically healthy dogs with no intestinal parasites. These samples served as both negative (*in natura*) and positive controls, when whole blood from the same animal were intentionally added to fecal samples to obtain 1, 5, 10, 20, and 40 milligrams of hemoglobin/g of feces (Hb/g). Fecal samples containing known Hb/g concentrations were evaluated according to two tests and in a double-blinded method by three clinical pathologists. As the strength of agreement between evaluators was significant ($p < 0.0001$) and moderate ($\rho < 0.90$), the mode of the tests results was compared to each other considering the presence (or absence) of blood in each sample analyzed and also their intensity classification (weakly, moderately, or strongly) when positive. In the samples forged with blood at a predetermined concentration, the presence of occult blood was detected from 1 mg Hb/g feces and no sample with a concentration of 40 mg Hb/g feces was classified as “negative” or “weakly positive”. gFOBT had better individual

performance in all analyzed variables, including sensitivity, positive and negative predictive values, positive and negative likelihood, accuracy, and feasibility in performing the test.

KEYWORDS: canine, feces, occult blood, fecal test.

INTRODUCTION

In veterinary, the fecal occult blood test (FOBT) has gained attention as it supports the detection of occult gastrointestinal (GI) bleeding caused by diseases or medications that may or may not cause chronic anemia^{1,2}. Given its feasibility and easy operability, it is not required to send the sample to be exclusively analyzed by laboratories, making it accessible to any professional in human and veterinary medicine who needs to detect invisible GI bleeding³.

The most cited test for FOB in the literature is tetramethylbenzidine or benzidine (bFOBT), a reagent used for centuries, especially in forensic medicine for the detection of traces of blood due to the heme peroxidase activity present in red blood cells^{4,5}. It also had its importance recognized in human oncology, serving as a model of screening test for the early detection of colon cancer³ and in the detection of FOB in canine patients with chronic kidney disease⁶. However, currently, other tests for FOB have been proposed and implemented in the routine given the recognized potentially carcinogenic effect of the main reagent of this test⁵. Thus, this technique requires the use of laboratory and personal protective equipment, in addition to trained professionals following all safety protocols for manipulation. Another point that can limit the use of benzidine for FOBT is the need for reagent preparation (fractionation, weighing, and dissolution of tetramethylbenzidine) since there is no complete commercial product available in the market⁴.

Due to the limitations and concerns regarding the use of benzidine, the guaiac fecal occult blood test (gFOBT) has gained recognition as a practical and low-cost alternative for humans⁷. Despite the small number of studies, the guaiac test has been shown to have several desirable characteristics for other animals². The gFOBT is commercially available, easy to

perform, and does not require any laboratory structure. Also, the pre-analytical phases can be performed by the owner at home after following some basic instructions, thus facilitating the acquisition of fecal samples and optimizing the time until results since (up to 14 days from sample collection and storage at 4°C to 25°C)⁸.

Considering the replacement of bFOBT by gFOBT in human patients suspected of GI bleeding, it was hypothesized that the same could be possible in dogs given the similarities of both test indications and biological samples used for it. Therefore, the aim of this study was to investigate and to compare the analytical sensitivity of FOBT using guaiac or benzidine reagents in fecal samples forged with known amounts of blood (mg of hemoglobin/g of feces) obtained from healthy dogs.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

This study was conducted at the Veterinary Hospital of the Federal University of Uberlândia (HV-UFU) between July and September 2020 after the approval of the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) (Protocol nº 017/2019).

After a pre-selection, a group of 6 healthy dogs (4 females: 2 spayed and 2 in diestrus and 2 intact males), with a median age of 4.83 ± 1.06 years and weight of 4.45 ± 1.09 kg was included in the study. The canine breeds represented were 5 mixed-breed and 1 Shih Tzu. In addition to being clinically healthy, all dogs had an adequate result in CBC and alanine aminotransferase activity, creatinine, total protein, and serum albumin concentrations, and also have three negative results for endoparasites in feces, and no melena/hematochezia was reported as clinical signs. Besides, given the lack of an independent and validated test to confirm the presence of canine hemoglobin in fecal samples, only those with negative results in both benzidine and guaiac tests were included (gFOBT and bFOBT).

As exclusion criteria we considered dogs with clinical and physical signs of any disease,

as well as those with any GI signs (hematochezia and/or melena, diarrhea, and visible endoparasites in the feces). Additionally, dogs were not included when they were under medication for GI disorders (e.g., phosphate binders, cytoprotective agents, histamine H2 receptor antagonists, and/or proton pump inhibitors), or receiving medications with the potential to cause GI tract erosions or ulcerations (e.g., anticoagulants, salicylates, non-steroidal anti-inflammatory drugs, glucocorticoids, antibiotics, prostaglandins, chemotherapy drugs).

2.2 Forged feces with increasing concentrations of dog's blood

After selection, new samples of feces and peripheral blood from the 6 dogs were collected by spontaneous defecation and venipuncture, respectively. Fecal samples from each dog were individually homogenized and fractionated using an analytical precision scale by the researchers (P.B.C and G.A.J.S) to obtain 6 aliquots of 1g of feces/sample (total of 36 aliquots of feces per dog). The first aliquot of the samples collected again from the selected patients was used as a “negative” control (in natura feces). The whole blood obtained were used to forge the other aliquots with a predetermined amount of blood and prepare the “positive” fecal samples for the fecal occult blood (FOB) detection by benzidine and guaiac tests. According to the literature, the lowest detection limit of fecal occult blood of the guaiac test is 10 mg of Hb/g of feces^{11,12}, thus samples were prepared to provide two concentrations below and two concentrations above this limit, resulting in 1, 5, 10, 20, and 40 mg Hb/g feces.

The exact amount of dogs' whole blood (in microliter) needed to obtain the predetermined concentrations of Hb/g of feces was calculated according to the following equation:

$$\mu L \text{ of blood added to } 1g \text{ of feces} = \frac{\text{desired concentration of } \frac{Hb}{g} \text{ of feces}}{\text{patient's Hb } (\frac{mg}{mL})} \times 1000$$

After adding the appropriate amounts of blood, all aliquots were individually and gently homogenized using a metal spatula, identified, and tested in the following order:

- a) Test of the *in natura* fecal aliquot (negative control);
- b) Test of fecal aliquots containing 1, 5, 10, 20 and 40 mg of Hb/g of feces.

To achieve multiple readings from the same aliquot, bFOBT and gFOBT tests were performed according to the methodology (described in items 2.3 and 2.4) in 6 repetitions for each aliquot (feces *in natura* and five different concentrations of mg of Hb/g of feces). For this purpose, 2 paper-discs containing 3 samples and 3 commercial cards containing 2 samples each from the same aliquot of feces were used to performed bFOBT and gFOBT tests, respectively (Figure 1).

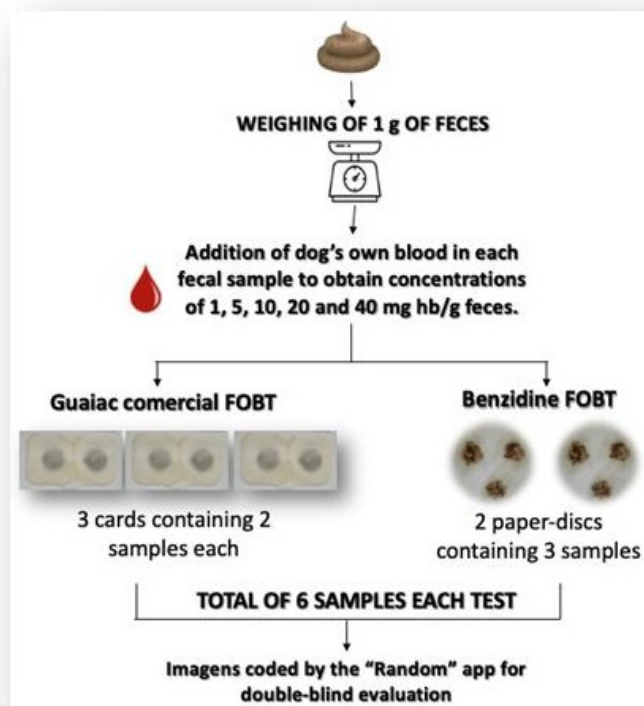


Figure 1. Graphic abstract of experimental protocol conducted, highlighting the steps to investigate and to compare the analytical sensitivity of FOBT using guaiac or benzidine

reagents in fecal samples forged with known amounts of blood (mg of hemoglobin/g of feces) obtained from healthy dogs.

All results were documented in photographic images for further classification and interpretation by three different clinical pathologists.

2.3 Basal ova and parasite test (O&P), bFOBT and gFOBT

Samples of fresh feces from the 6 selected dogs were collected by spontaneous defecation and sent to the Clinical Pathology Laboratory of the Veterinary Hospital of Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil (HV-UFU) for direct O&P investigation and the detection of *Ancylostoma* spp., *Toxocara* spp., *Ascaris* spp., and oocysts of protozoa such as *Isospora* spp., *Eimeria* spp., and *Giardia* spp. by the Willis's method.

To perform the bFOBT, the samples of feces were smeared on a paper-disc. Then 50 µL of a solution with 1 mL of 50% acetic acid and 10 mg of benzidine was added. A wooden spatula was used for homogenization and 3 drops of hydrogen peroxide were added to each sample. The observation of a bluish halo in any sample was considered a “positive” reaction to the presence of blood in the feces. The test was repeated six times on the same sample according to the same method.

The interpretation of the results was performed after 30 seconds of the reagents inclusion as recommend in the literature^{6,9}. The absence of change in color sample has been considered negative for blood presence. Conversely, the observation of a bluish stain on the surface of the paper has been interpreted as a positive result and the blood presence was classified according to its intensity as 1 for “weakly”, 2 for “moderately”, and 3 for “strongly” positive^{6,10} (Figure 2).

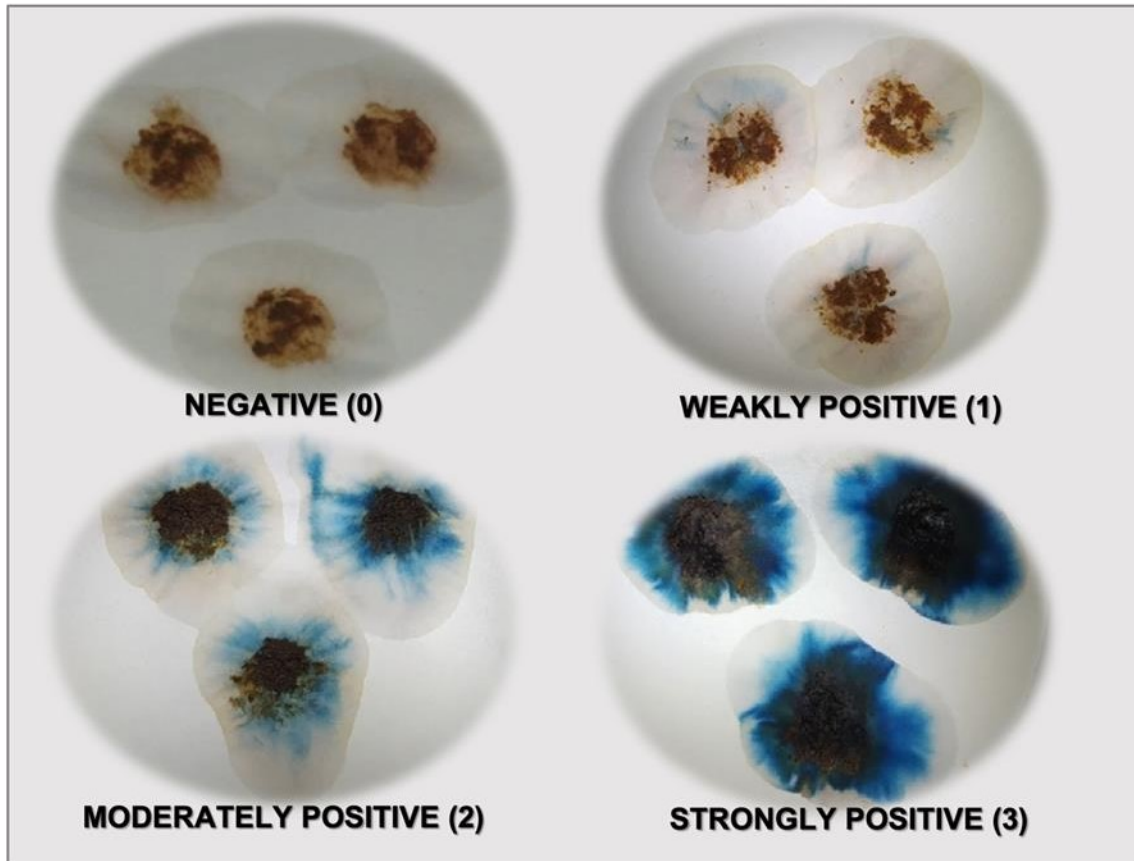


Figure 2. Visual interpretation of the results for the presence and intensity of fecal occult blood using benzidine reagent.

The gFOBT test⁸ was performed according to the manufacturer's recommendations. Thin layers of feces were smeared inside both circles of the 3 commercial kit's envelope using different spatulas. Then the test was repeated six times on the same sample, using the same method as well. On the back of the envelope, three drops of the developer fluid were dropped in each circle, and a reading was performed after 30 seconds. If the blue/green color were identified, the sample had FOB and the result was considered “positive”, and in the absence of this, the result was considered “negative” (Figure 3).

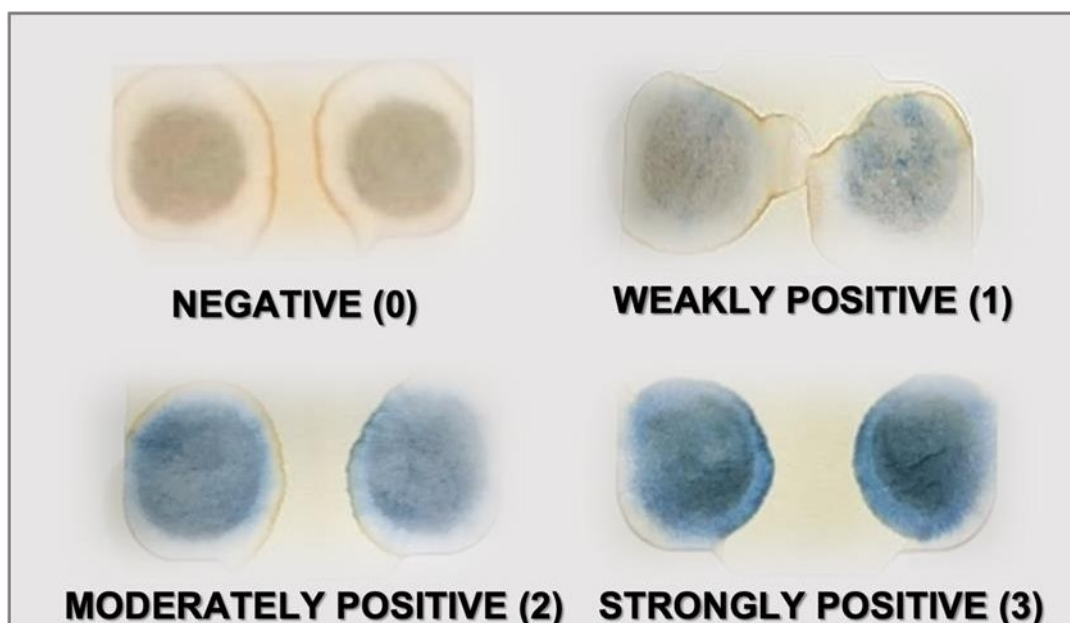


Figure 3. Visual interpretation of the results for the presence and intensity of fecal occult blood using guaiac reagent.

2.4 Reading and interpretation of the gFOBT and bFOBT

After obtaining the standard images, under the same lighting, exposure, camera, and location, random codes containing five digits (letters and numbers) were created. The number of codes was proportional to the number of photographs obtained, and each code was used to rename each sample so that the photographs were shuffled for later evaluation. Three separate reports were generated, one for each specialist in veterinary clinical pathology to be double-blinded analyzed.

The application used to generate the images was the “Random” version 1.2 (<https://play.google.com/store/apps/details?id=com.start.devaneio.aleatorio>). Both the images in JPG format and the blue scale classification pattern, based on the literature^{6,9} and proposed by the researchers (Figures 1 and 2) were available for the three evaluators. The data was analyzed using two classifications for positivity, that is, “absence vs. presence” of occult blood (scores 0 and 1, respectively), and intensity, that is, “absence vs. intensity of fecal occult bleeding - weakly, moderately and strongly positive” (scores 0, 1, 2 and 3, respectively).

2.5 Statistics

The following variables were calculated: Sensitivity $[a/(a+b)]$, specificity $[d/(c+d)]$, positive predictive value $[a/(a+c)]$, negative predictive value $[d/(b+d)]$, positive likelihood ratio $[Sens/(1-Esp)]$, negative likelihood ratio $[(1-Sens)/Esp]$ and accuracy $[(a+d)/(a+b+c+d)]$, in which “a” = true positive values, “b” = false negative values, “c” = false positive values and “d” = true negative values¹³. All the first fecal samples were considered true negative, becoming true positive when added with any amount of blood (1, 5, 10, 20, or 40 mg Hb/g feces). These basal samples containing any amount of blood were considered false positives and the samples forged with the blood but with negative results according to the evaluators were classified as false negatives as well as the forged samples classified as negative were considered false negatives. The results of the three evaluators were tested for the degree of agreement by the Kappa statistical method (ρ_c , intraclass correlation coefficient) and 95% of confidence interval. As the strength of agreement between evaluators was significant ($p < 0.0001$) and moderate ($\rho_c < 0.90$), the mode of the results, i.e., classification and intensity that occurs most frequently from each sample analyzed by the three clinical pathologists was used to determine presence or absence of FOB, and also used to establish the classification of the intensity (weakly, moderately, or strongly) of each positive sample. Data was comparing using the Chi-square test.

RESULTS

A total of 486 images were generated from fecal samples from the six dogs and six different concentrations of Hb/g of feces, which were originated from 198 images of benzidine tests (2 replicates with 3 tests in each paper-disc) and from 288 guaiac tests (3 repetitions of commercial tests containing 2 circles each). They were all blindly evaluated by three clinical

pathologists.

Regarding intensity (scores 0, 1, 2 and 3), the Kappa coefficient result was 0.477, indicating that there was a moderate agreement between the classification of the pathologists ($p < 0.0001$). When positivity was added to the classification, the Kappa coefficient increased to 0.772 ($p < 0.0001$), that is, a high agreement between the evaluators.

When intensity was analyzed separately, the agreement between them decreased (Kappa = 0.304 for guaiac and Kappa = 0.298 for benzidine). Also, agreement regarding positivity was reduced for the benzidine test (Kappa = 0.639) and increased for the guaiac test (Kappa = 0.881).

As there was an agreement between the evaluators, the tests were compared according to the mode results of bleeding intensity (Table 1) and concentrations of Hb/g of feces (0, 1, 5, 10, 20 and 40 mg) for each one of the tests individually (Tables 2 and 3).

Table 1. Contingency table for the comparison of the benzidine and guaiac test on the intensity of bleeding and against the different concentrations of mg Hb/g feces.

TEST	BLEEDING INTENSITY				TOTAL
	NEGATIVE (0)	POSITIVE			
		Weakly (1)	Moderately (2)	Strongly (3)	
Benzidine	10 (100%)	9 (05%)	24 (12%)	147 (74%)	108
Guaiac	10 (100%)	45 (16%)	219 (76%)	0 (02%)	288
Total	36	54	243	153	486

CONCENTRATION (mg Hb/g feces)					
0	36 (100%)	0	0	0	36
1	0	33 (37%)	45 (50 %)	12 (13%)	90
5	0	9 (10%)	48 (53%)	33 (37%)	90
10	0	3 (03%)	54 (60%)	33 (37%)	90
20	0	9 (10%)	45 (50%)	36 (40%)	90
40	0	0	51 (57%)	39 (43%)	90
Total	36	54	243	153	486

Considering the analysis of mode as a result of the FOB tests, 100% of the true negative samples had been classified as “negative”, and none of the forged samples containing 40 mg Hb/g feces were classified as “weakly positive” ($p<0.0001$). Regarding the positive samples, 76% of the positive gFOBT results were classified as "moderately positive", while 74% of the positive FOBT were considered "strongly positive" ($p<0.0001$). When evaluated separately by the different concentrations of added blood, the most part of them were classified as "moderately positive" (50%, $n=81$), even the samples containing 1 mg Hb/g of feces.

Table 2. Contingency table regarding the classification of bleeding intensity at different concentrations by the benzidine test.

Table 3. Contingency table regarding the classification of bleeding intensity at different

CONCENTRATION (mg Hb/g feces)	BLEEDING INTENSITY				TOTAL
	Negative (0)	Positive			
		Weakly (1)	Moderately (2)	Strongly (3)	
0	18 (100%)	0	0	0	18
1	0	9 (25%)	15 (42%)	12 (33%)	36
5	0	0	6 (17%)	30 (83%)	36
10	0	0	3 (08%)	33 (92%)	36
20	0	0	0	36 (100%)	36
40	0	0	0	36 (100%)	36
Total	18	9	24	147	198

concentrations by the guaiac test.

CONCENTRATION (mg Hb/g feces)	BLEEDING INTENSITY				TOTAL
	Negative (0)	Positive			
		Weakly (1)	Moderately (2)	Strongly (3)	
0	18 (100%)	0	0	0	18
1	0	24 (44.5 %)	30 (55.5%)	0	54
5	0	9 (17 %)	42 (78%)	3 (05%)	54
10	0	3 (05 %)	51 (95%)	0	54
20	0	9 (17%)	45 (83%)	0	54
40	0	0	51 (95%)	3 (05%)	54
Total	18	45	219	6	288

When the performance of the tests was evaluated separately to classify the intensity of bleeding in the different concentrations of Hb in feces, there was greater tendency to classify “moderately intensity” (>78%) from 5 mg Hb/g feces by the guaiac test and o “strongly positive” intensity (>83%) by the benzidine test. It is worth mentioning that, in all analyzes performed, no blood-free sample was classified as positive, and no sample containing 40 mg Hb/g feces was classified as “weakly positive”. However, this additional analysis allowed us

to verify that the benzidine test classified all samples with concentrations greater than 20 mg Hb/g feces as “strongly positive”, while guaiac classified only 5% of samples containing 40 mg Hb/g feces as “strongly positive”.

The guaiac test had the best performance, with 94% sensitivity and 99% specificity. The benzidine test had the same result for specificity (99%), but moderate sensitivity (78%). A lower performance of benzidine was observed in detecting true positives within fecal samples that contained blood, this did not affect the positive predictive values, or the negative predictive values of this test. The total proportion of correct results was significantly strongly in both tests, reflecting the accuracy of both benzidine and guaiac in identifying fecal samples containing occult blood (97% and 99% accuracy, respectively). Regarding the positive and negative likelihood, both tests had good performance, with higher LR+ results and lower LR- values (Table 4).

When individual tests performances were evaluated, the sensitivity did not change (78% for benzidine, and 94% for guaiac). In turn, specificity was reduced at the concentration of 1 mg of Hb/g of feces (from 99% to 97% in benzidine, and 98% in guaiac) and reached the maximum efficiency (100% for both benzidine and guaiac) for concentrations above 5 mg Hb/g of feces (Table 4).

Table 4. Data from epidemiological results for fecal occult blood tests by benzidine and guaiac methods in canine fecal samples with pre-established concentrations of hemoglobin per sample (mg Hb/g feces).

	BENZIDINE	GUAIAAC
Sensitivity	78%	94%
Specificity	99%	99%
PPV	93%	94%
NPV	98%	99%
LR+	78	94
LR-	0,22	0,06
Accuracy	97%	99%

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR+, positive likelihood ratio; LR-, negative likelihood ratio.

DISCUSSION

The results showed that both tests were able to identify hemoglobin concentrations below than expected by the gFOBT manufacturer (10.8 - 15.6 mg Hemoglobin/g stool)¹, and also confirm the hypothesis that gFOBT could be a potential substitute for bFOBT in several situations, especially when gastrointestinal bleeding is suspect, such as neoplastic and non-neoplastic gastroduodenal ulcerations^{2,3}, chronic kidney disease⁶ and/or the use of some drugs potentially ulcerogenic².

In fresh feces (containing 0 mg Hb/g feces), all pathologist reported negative result for occult blood feces in the samples control negative, highlighting the possibility of using these tests to rule out the occurrence of FOB. On the other hand, for many of them, the “strongly positive” (score 3) by the benzidine (74%) test and “moderately positive” (score 2) by the guaiac test (76%), were the predominant results, which demonstrates a tendency to overestimate and/or underestimate the amounts of fecal occult blood when using different tests.

There was no false negative in samples containing 40 mg Hb/g feces (concentration 4 times higher than the limit of detection). Also, all samples containing concentrations under the test detection limit of 10 mg Hb/g feces were classified as “positive”, ranging from “weakly” to “strongly positive”. Notably, from 5 mg of Hb/g feces, 53% of the samples were classified as “moderately” and 37% as “strongly positive” with the benzidine test being that was responsible for 83% of the “strongly positive” results, against only 5% of the guaiac test. In light of these results, it is important to measure the sensitivity of the benzidine reagent in real GI bleeding, since it has major reactions to very small amounts of blood, which could occur during defecation itself or even originate from a dog’s diet with high animal protein^{11,12}.

The test based on the guaiac reagent had better performance than benzidine in 5 out of the 7 statistical tests performed. High sensitivity and specificity demonstrates that in a population of dogs with occult gastrointestinal bleeding, the guaiac test can identify 94% of

them, likewise in a population of dogs that do not have occult gastrointestinal bleeding, it can confirm the absence of blood in the fecal sample in 99% of the cases¹⁴

Although the benzidine reagent-based test did not had the same sensitivity performance as the guaiac-based test (78% vs. 94%, respectively), the previous showed “positive” and “negative” predictive values as high as the guaiac test. In this context, it was found that the probability of having or not having true GI bleeding in the face of a “positive” or a “negative” result in bFOBT is very high (93% and 98%, respectively). Thus, maybe the moderate sensitivity found in the benzidine test could be attributed to an error in the double-blinded analysis performed by the pathologists¹⁴.

Likelihood ratios (LR) combines sensitivity and specificity to quantify how useful a new diagnostic test is for change (increase or decrease) the probability of having a disease compared to the prevalence of that disease in the studied population. Positive LR was 94 vs. 78 for gFOBT and bFOBT, respectively; and gFOBT negative LR was 0,06 vs. 0,22 for bFOBT. Considering that LR+ varies from 1 to infinity, and LR- varies from 1 to zero¹⁵, our results showed that gFOBT performed better in both likelihood ratios, since guaiac presents greater probability of actually detect SOF towards a positive gFOBT, and also has a lower probability of detect SOF when a gFOBT has been resulted negative.

Accuracy, a measure used to assess the total proportion of correct results¹⁴, was high in both tests. Such results show that both tests were capable to diagnose occult blood in the feces of dogs. Finally, after comparing all the results found for the benzidine reagent with those of the guaiac reagent, the latter had better individual performances in all analyzes. It is believed that gFOBT performance may be related to the fact that this test is commercially available, which would generate, at first, not only feasibility in carrying out the tests but less operator-dependent interference. In contrast, bFOBT requires several pre-analytical steps such as weighing the reagent at the laboratory, preparing a 50% acetic acid solution and the benzidine

solution itself. Additionally, the use of gFOBT seems to be safer and does not pose any risk to the test handler, since it does not have carcinogenic potential like benzidine⁴.

It is worth mentioning that this pilot study used fecal samples from clinically healthy animals. Therefore, new studies in dogs with GI lesions confirmed by GI endoscopy or even necropsy will be needed to validate the results found by this research.

CONCLUSION

The bFOBT and gFOBT tests were able to detect blood concentrations from 1 mg Hb/g feces. The benzidine reagent had good analytical sensitivity for the detection of occult blood in the feces of domestic healthy dogs and the gFOBT presented a better individual performance in all analyzed variables, including sensitivity and feasibility in the execution of the test.

REFERENCES

1. Harewood GC, McConnell JP, Harrington JJ, Mahoney DW, Ahlquist DA. Detection of occult upper gastrointestinal tract bleeding: Performance differences in fecal occult blood tests. *Mayo Clin Proc.* 2002;77(1):23-28. doi:10.4065/77.1.23.
<https://doi.org/10.4065/77.1.23>
2. Pierini A, Bartoletti F, Lubas G, Gori E, Marchetti V. The guaiac-based fecal occult blood test in healthy dogs: Evaluation of the effects of diet, and the ability of the test to detect fecal occult blood. *Vet Clin Pathol.* 2020;49(1):71-77.
<https://doi.org/10.1111/vcp.12829>
3. Benton SC, Seaman HE, Halloran SP. Faecal Occult Blood Testing for Colorectal Cancer Screening: the Past or the Future. *Curr Gastroenterol Rep.* 2015;17(2).
<https://doi.org/10.1007/s11894-015-0428-2>
4. Syed AA, Khatoon BA, Silwadi MF. New reagents for detection of faecal occult blood. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;24(4):581-586. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00454-4](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00454-4)

5. Onofri V. rom Theory to Practice: The Biological Findings. 2015;5(3):96-103.
6. Crivellenti LZ, Borin-Crivellenti S, Fertal KL, Contin CM, Miranda CMJ, Santana AE. Occult gastrointestinal bleeding is a common finding in dogs with chronic kidney disease. *Vet Clin Pathol*. 2017;46(1):132-137. <https://doi.org/10.1111/vcp.12461>
7. Shapiro JA, Bobo JK, Church TR, et al. A Comparison of Fecal Immunochemical and High-Sensitivity Guaiac Tests for Colorectal Cancer Screening. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(11):1728-1735. <https://doi.org/10.1038/aig.2017.285>
8. DIAGNOSTICA I. INLAB DIAGNOSTICA 2000 bula do produto Fecca Cult® Teste para “Pesquisa de sangue oculto nas fezes” Published 2000. www.interlabdist.com.br
9. Narita T, Tomizawa N, Sato R, Goryo M, Hara S. Effects of long-term oral administration of ketoprofen in clinically healthy beagle dogs. *J Vet Med Sci*. 2005;67(9):847-853. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.847>
10. Narita T, Sato R, Motoishi K, Tani K, Naito Y, Hara S. The interaction between orally administered non-steroidal anti-inflammatory drugs and prednisolone in healthy dogs. *J Vet Med Sci*. 2007;69(4):353-363. doi:10.1292/jvms.69.353. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.353>
11. Rice JE, Ihle SL. Effects of diet on fecal occult blood testing in healthy dogs. *Can J Vet Res*. 1994;58(2):134-137.
12. Tuffli SP, Gaschen F, Neiger R. Effect of dietary factors on the detection of fecal occult blood in cats. *J Vet Diagnostic Investig*. 2001;13(2):177-179. <https://doi.org/10.1177/104063870101300218>
13. Schoonjans F, Zalata A, Depuydt CE, Comhaire FH. MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Comput Methods Programs Biomed*. 1995;48(3):257-262. [https://doi.org/10.1016/0169-2607\(95\)01703-8](https://doi.org/10.1016/0169-2607(95)01703-8)
14. Celentano DD, Szklo M, Gordis L. *Gordis Epidemiology*. 6 th. (Elsevier, ed.); 2019.
15. Jr H, W. D, Lemeshow S, Sturdivant RX. *Applied Logistic Regression*. 3 th. (John

Wiley & Sons, ed.); 2013.

CAPÍTULO III – PESQUISA DE SANGUE OCULTO FECAL EM CÃES COM HIPERCORTISOLISMO PITUITÁRIO-DEPENDENTE

Artigo a ser publicado na revista Veterinary Clinical Pathology

PESQUISA DE SANGUE OCULTO FECAL EM CÃES COM HIPERCORTISOLISMO
PITUITÁRIO-DEPENDENTE

Paula Barbosa Costa¹; Izabella Gradini Ayello¹; Fernanda Nastri Gouvêa¹; Luana Oliveira Branco¹; Hévila Dutra Barbosa de Cerqueira¹, Nathan da Rocha Neves Cruz²; Alef Winter Oliveira Alvarenga¹; Márcio Machado Costa³, Leandro Zuccolotto Crivellenti^{1,3}, Sofia Borin-Crivellenti^{1,3*};

¹ Graduate Program in Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

² School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

³ College of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: Sofia Borin Crivellenti, College of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, Mato Grosso Avenue, 3289, 38405-314, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: sofiabcrivellenti@ufu.br.

RESUMO

O hipercortisolismo causa uma gama de alterações multissistêmicas clínicas, dermatológicas, hematológicas, urinárias, dentre outras. No sistema gastrointestinal, sabe-se sobre os efeitos potentes nocivos ulcerogênicos da cortisona sintética, no entanto, esses ainda não se aplicam à superexposição ao cortisol endógeno. Por este motivo, aventou-se a necessidade de pesquisar

sangue oculto fecal em pacientes com hipercortisolismo pituitário-dependente (HCPD). Vinte e dois cães com HCPD foram alocados em dois grupos, 16 recém-diagnosticados ou tratados descompensados (controle positivo - hipercortisolêmico) e seis tratados compensados (controle negativo – normocortisolêmico). Todos foram submetidos ao teste de sangue oculto fecal guáico (gTSOF) e tiveram suas amostras classificadas às cegas por três patologistas clínicos veterinários de acordo com resultados colorimétricos do teste gTSOF. Os resultados foram analisados às vistas de três distintos cenários, os quais visaram testar a hipótese de que cães com HC pudessem apresentar SOF, levando também em consideração a alta sensibilidade do gTSOF em detectar presença de hemoglobina canina. Embora tenha havido certo grau de concordância entre os avaliadores em praticamente todas as análises, obtivemos resultados antagônicos quanto a presença e ausência de SOF quando os resultados foram confrontados dentro dos cenários propostos. Dessa maneira, não foi possível afirmar se caninos hipercortisolêmicos ou normocortisolêmicos, portadores de hipercortisolismo pituitário-dependente, possuem ou não sangramento oculto fecal detectado pelo método guáico.

Palavras-chaves: Caninos, cortisol sérico, guáico, sangue oculto fecal

ABSTRACT

Hypercortisolism causes a range of multisystemic alterations, such as clinical, dermatological, hematological, and urinary the harmful ulcerogenic effects of synthetic cortisone is well described, however, these still do not apply to overexposure to endogenous cortisol. For this reason, the need to screen faecal occult blood in patients with pituitary-dependent hypercortisolism (HCPD) has been suggested. Twenty-two dogs with HCPD were randomized in two groups: The first with 16 newly diagnosed pharmacologically uncontrolled (positive control - hypercortisolemic) and six pharmacologically controlled (negative control - normocortisolemic). The guaiac faecal occult blood test (gFOBT) was performed in faecal

samples of all animals and occult blood was blindly graded by three veterinary clinical pathologists according to colorimetric results of the gTSOF test. The results were analysed according to three different scenarios which aimed to test the hypothesis that dogs with HC could present FOB, also taking into consideration the high sensitivity of gFOBT in detecting the presence of canine haemoglobin. Despite a certain degree of agreement between the evaluators in almost all analyses, we obtained antagonistic results regarding the presence and absence of FOB when the results were compared within the proposed scenarios. Thus, it was not possible to state whether hypercortisolemic or normocortisolemic dogs diagnosed with pituitary-dependent hypercortisolism, have occult fecal bleeding or not by the guaiac method.

KEYWORDS: Canine, serum cortisol, guaiac, faecal occult blood

INTRODUÇÃO

O eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal apresenta um importante papel na integridade da mucosa gástrica e intestinal. Sabidamente os glicocorticoides (GCs) exercem dualidades antagônicas na mucosa gástrica por apresentarem propriedades gastroprotetoras fisiológicas e poulcerogênicas patológicas (Filaretova *et al.* 2020; Reinau *et al.* 2018).

Vários tecidos, incluindo a mucosa gástrica, apresentam receptores para GCs. A ação favorável dos anti-inflamatórios esteroidais nesse tecido está relacionada à manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, estimulação da secreção de muco e processos de reparo, bem como na atenuação de mecanismos patogênicos locais tais como a hipermotilidade gástrica e de aumento de permeabilidade microvascular (Filaretova *et al.* 2020). Em contrapartida, por influenciarem na hemostasia da glicose e causarem importantes efeitos catabólicos, os GCs são bastante reconhecidos por sua ação ulcerogênica (Filaretova *et al.* 2009).

O hipercortisolismo (HC), desequilíbrio hormonal multissistêmico conhecido como “síndrome de Cushing”, possui manifestações clínicas e laboratoriais bastante conhecidas,

dentre as quais destacam-se poliúria, polidipsia, polifagia, ganho de peso, alopecia simétrica não pruriginosa, telangiectasia abdominal, trombocitose, leucograma de estresse (principalmente linfopenia), elevação da atividade das enzimas hepáticas (principalmente da fosfatase alcalina) e diminuição da densidade urinária (Bennaim *et al.* 2019; O'Neill *et al.* 2016).

Sabendo que melena e/ou hematoquezia não são achados clínicos comuns nos cães com HC, e diante da capacidade ulcerogênica dos GCs no sistema gastrointestinal, hipotetizou-se que cães portadores de HC pudessem apresentar sangramentos ocultos gastrintestinais (Bennaim *et al.* 2019; Rice & Ihle 1994).

Assim, esta pesquisa objetivou verificar a ocorrência de sangramento oculto fecal (SOF) em cães portadores de hipercortisolismo espontâneo utilizando o teste comercial à base do reagente guáiaico.

MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo nº 052/2020), foram selecionados, inicialmente, 24 cães adultos portadores de hipercortisolismo (HC) pituitário-dependente (HCPD) oriundos do Serviço Endocrinologia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Federal de Uberlândia (HV-UFU), vacinados e vermifugados, recém-diagnosticados ou em tratamento para HCPD, no período maio de 2021 a agosto 2022.

Vinte e quatro cães com HCPD foram pré-selecionados após os responsáveis dos cães estarem de acordo com o termo de consentimento e autorizarem a inclusão de seu animal neste estudo de forma voluntária. Desses, dois animais foram excluídos antes de iniciarem os gTSOF por desenvolverem diabetes *mellitus* concomitante ao HCPD. Dessa maneira, o grupo final foi constituído por 22 cães, dos quais 16 eram portadores de HCPD recém-diagnosticados ou tratados descompensados (grupo HCPD hipercortisolêmico; controle positivo), e seis eram

portadores de HCPD, tratados com trilostano e com cortisol controlado (grupo HCPD normocortisolêmico; controle negativo).

O diagnóstico para HCPD foi baseado nos sinais clínicos, no exame físico, nas alterações laboratoriais, nos achados ultrassonográficos e nas provas funcionais hormonais. Cinco dos 22 pacientes foram considerados portadores de HC quando as concentrações de cortisol pós-ACTH apresentaram-se superiores a 22 mcg/dL (teste de estimulação com ACTH; TEACTH) e 17/22 animais tiveram diagnóstico para HC quando verificou-se falha na supressão do cortisol 8 horas após a administração de dexametasona ($>1,4$ mcg/dL) (teste de supressão com baixa dose de dexametasona; TSBBD). Todos foram classificados como HC de origem pituitária (HCPD), pois apresentavam aumento bilateral de um ou ambos os polos das adrenais, ausência de imagem ultrassonográfica sugestiva de neoplasia adrenal e/ou tomografia craniana evidenciando a presença de neoplasia hipofisária (Behrend *et al.* 2013). Adicionalmente, os pacientes que tiveram seu diagnóstico realizado pelo TSBBD apresentaram concentração de cortisol após 4 horas da dexametasona $< 1,4$ mcg/dL ou $< 50\%$ da concentração de cortisol basal. Todos os cães com HCPD sob tratamento faziam uso do fármaco trilostano (dose inicial 0,5 a 1 mg/kg, q12h) e eram monitorados pelo TEACTH para ajustes de doses periodicamente (q3-4 meses) (Lemetayer & Blois 2018; Wehner *et al.* 2021).

Cães que tivessem utilizados fármacos causadores de lesões gastroentéricas nos últimos 30 dias (p.ex.; corticosteroides e anti-inflamatórios não esteroidais) e/ou apresentassem sangramentos fecais macroscópicos (melena e/ou hematoquezia), anemia ou verminoses detectadas nos exames hematológicos e coproparasitológicos, respectivamente, de triagem ou qualquer outra comorbidade crônica foram excluídos da pesquisa.

Os exames de triagem foram realizados no Laboratório de Patologia Veterinária Clínica do HV-UFU. Amostras de sangue foram coletadas para realização de hemograma (Sysmex poch-100iv e Urit 3000 plus; Sysmex e MHLab) e avaliação bioquímica sérica (triglicerídeos,

colesterol, ureia, creatinina, alanina transferase [ALT], fosfatase alcalina [FA] e glicemia - Labmax pleno; Labtest), bem como amostras de fezes para realização de exames fecais (Faust, Willis e Direto) (BOWMAN, 2013; MATZ; GUILFORD, 2003; MESQUITA et al., 2017) para verificação/exclusão da presença de parasitas intestinais.

Após analisados os exames de triagem, 22 cães encaixaram-se nos critérios de seleção e foram alocados nos seguintes grupos experimentais:

- a) Cães HCPD hipercortisolêmicos (controle positivo):** caninos portadores de HCPD recém-diagnosticados (cortisol 8h pós-dexametasona > 1,4 ug/dL ou cortisol pós-ACTH > 22 ug/dL) ou tratado descompensado (cortisol pós-ACTH > 5 ug/dL) segundo os critérios da ESVE (*European Society of Veterinary Endocrinology*);
- b) Cães HCPD normocortisolêmicos (controle negativo):** caninos portadores de HCPD tratados e compensados (cortisol pós-ACTH 2-5 ug/dL) segundo os critérios da ESVE (*European Society of Veterinary Endocrinology*).

A pesquisa de sangue oculto fecal (SOF) foi realizada em todos os animais partir das fezes frescas obtidas após defecações espontâneas e por meio de kit comercial que se utiliza do método guáico¹ (gTSOF) (Fig. 1A). Os testes para avaliação da presença de SOF foram realizados conforme as recomendações do fabricante. Após coleta das fezes em recipiente estéril², abria-se um teste pela frente do cartão (Fig. 1B) e removia-se todo papel protetor da parte interna, expondo as duas janelas de recepção de amostras fecais (Fig. 1C). Usando uma das espátulas fornecida pelo próprio teste, cobria-se completamente a janela A com parte das fezes. Ato contínuo, trocava-se a espátula por uma nova, e cobria-se a janela B com outra porção da mesma amostra fecal (Fig. 1D). O teste então era selado por meio da “presilha clique” (Fig.

¹ Hexagon OBScreen®, In Vitro Diagnóstica.

² Coletor universal estéril 80 ml graduado tampa vermelha JProLab®, Ind. Com. De produtos para laboratório LTDA.

1E). A amostra, estável em temperatura ambiente, que poderia ser testada dentro de um período de até 14 dias depois da coleta conforme a bula do produto, foi testada no prazo máximo de 24 horas após a coleta das fezes em todos os cães. Para tanto, a cobertura da parte traseira (Fig. 1E) era aberta e completamente removida pela pesquisadora, expondo o outro lado das janelas A e B contendo as amostras fecais. Aplicava-se então 1 gota de citrato de sódio 0,1 mmol/L em solução etanólica (reagente fornecido pelo kit comercial). Após penetração da primeira solução, aplicava-se 1 gota de peróxido de hidrogênio 3% em solução etanólica (reagente fornecido pelo kit comercial) (Fig. 1F).

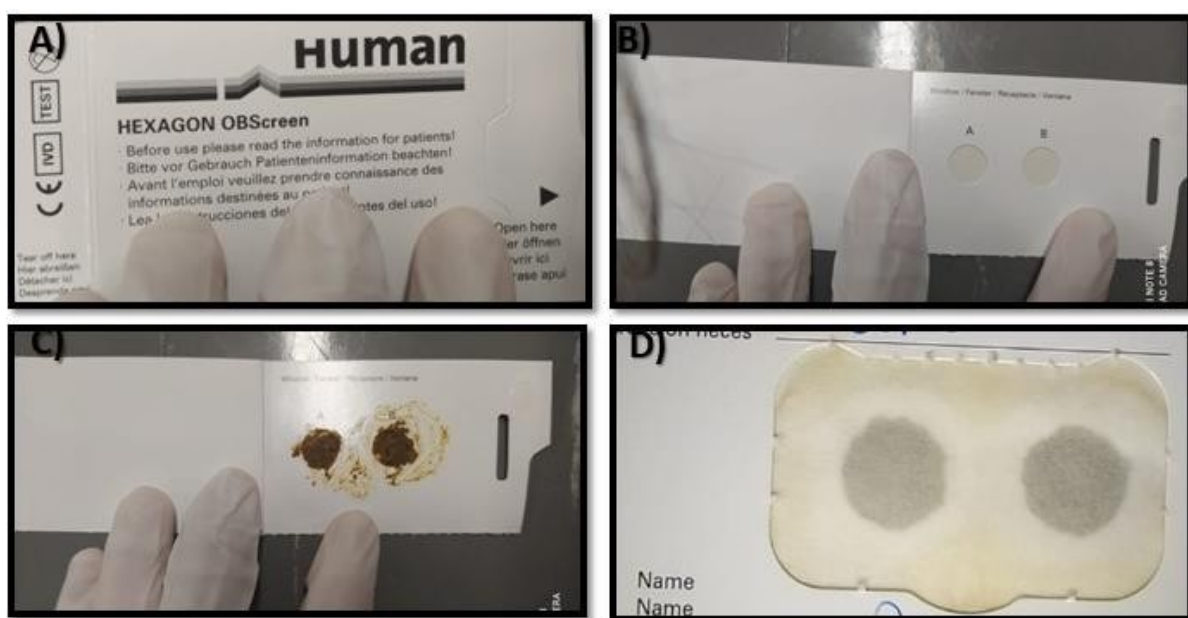


Figura 1. Resumo da apresentação da técnica do teste de sangue oculto fecal guaiaco. **A.** Frente do gTSOF. **B.** Apresentação dos círculos em que se aplicam as amostras de fezes. **C.** Exemplificação dos círculos após aplicação das fezes. **D.** Parte de trás do cartão onde se realiza aplicação dos reagentes e, consecutivamente, a leitura do teste (OBScreen 2021).

Registros fotográficos sob a mesma luz, tempo de exposição, câmera (smartphone) e localização foram obtidos de todos os resultados dos gTSOF 30 segundos após a aplicação das soluções teste, conforme recomendação do fabricante. As imagens foram identificadas com códigos aleatórios, esses criados pelo portal de ferramentas online 4Devs (https://www.4devs.com.br/gerador_de_senha), e foram encaminhadas eletronicamente pela pesquisadora principal, às cegas, para três avaliadores *expertise* na área de patologia clínica

veterinária para realizar a leitura dos testes. Conjuntamente aos registros fotográficos, também fora enviada aos avaliadores uma prancha contendo os possíveis resultados colorimétricos do teste gTSOF, na qual ausência de mudança de cor na amostra era considerada negativa para a presença de SOF e a observação de qualquer ponto/mancha azulada/esverdeada em qualquer uma das janelas era considerada positiva para SOF, sendo classificada de acordo com sua intensidade como 1 para "fracamente", 2 para "moderadamente" e 3 para "fortemente" positivo (Fig.2).

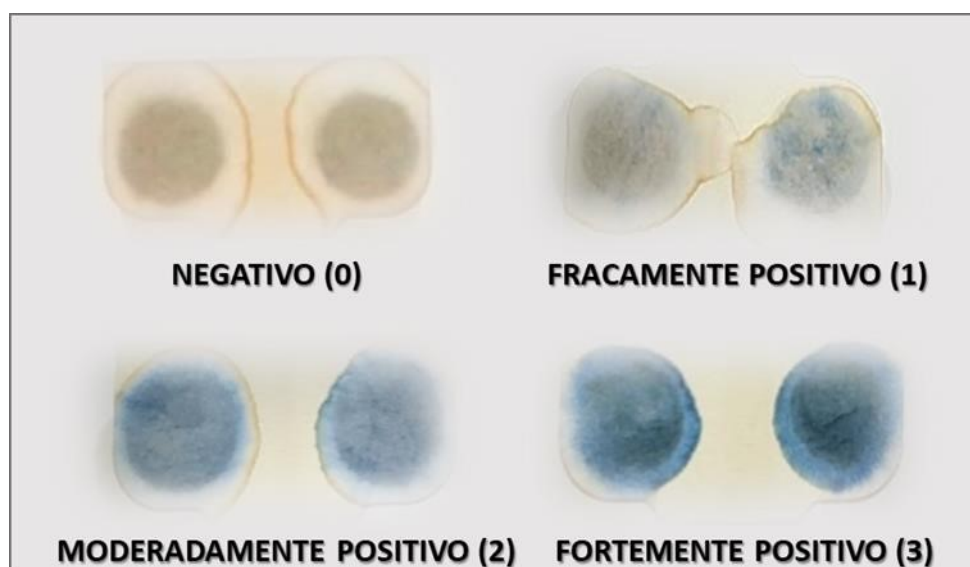


Figura 2. Interpretação visual dos resultados quanto à presença e intensidade de sangue oculto nas fezes utilizando o reagente guáiac adaptado de Narita *et al.* (2005).

Após a recepção dos resultados, a equipe de pesquisa propôs, como forma de avaliação e comparação dos resultados do gTSOF, três distintos cenários, que não somente buscaram testar a hipótese aventada de que cães com HC possam apresentar SOF, mas que também levaram em consideração a alta sensibilidade do gTSOF em detectar presença de hemoglobina canina (dados ainda não publicados³). Para tanto, os resultados contendo os escores dos gTSOF de todos os animais, enviados pelos avaliadores, foram organizados e/ou reclassificados pela pesquisadora principal, gerando os seguintes cenários:

³ Dados constantes no artigo intitulado *In vitro performance evaluation of a commercial guaiac based fecal blood occult test for dogs*, submetidos à Veterinary Clinical Pathology, contidos no Capítulo 2 desta tese.

Cenário 1 – considerou-se o escore 0 como “ausência” para SOF e escores 1, 2 e 3 como “presença” para SOF [logo, 0=0; e 1, 2 e 3=1], objetivando-se verificar se há ou não presença de SOF em cães com hipercortisolismo espontâneo;

Cenário 2 - considerou-se o escore 0 e 1 como “ausência” para SOF e escores 2 e 3 como “presença” para SOF [logo, 0 e 1=0; 2 e 3=1], objetivando reduzir um possível efeito da alta sensibilidade do gTSOF para quantidades mínimas de hemoglobina presentes em amostras fecais (< 1 mg Hb/g fezes) observadas em estudo piloto (dado ainda não publicado³) ou ainda de variabilidades individuais na classificação do escore 1;

Cenário 3 - considerou-se os escores originalmente propostos, os quais 0 representa “ausência” de SOF e os escores 1, 2 e 3 como fracamente, moderadamente e fortemente positivos para SOF [0=0; 1= (+); 2= (++) e 3= (+++)], respectivamente.

Análises estatísticas

O teste Binominal de uma proporção foi utilizado para comparar presença ou ausência de SOF nas amostras fecais em cada um dos cenários propostos (1, 2 e 3), enquanto o teste Binominal de duas proporções foi aplicado para verificar diferença nos resultados entre os grupos estudados, ou seja, entre pacientes com HCPD hipercortisolêmicos (recém-diagnosticados ou tratados descompensados) e pacientes com HCPD normocortisolêmicos (tratados compensados). Para dados independentes, utilizou o teste Wilcoxon para amostras independentes para verificar se a moda dos escores entre os grupos estudados diferia dentro do cenário 3. A concordância entre os avaliadores foi testada pelo método Kappa de Fleiss (κ ; p-valor) em cada um dos cenários e grupos propostos, onde $\kappa < 0$ = insignificante, $0 < \kappa < 0,2$ = fraca; $0,21 < \kappa < 0,4$ = razoável; $0,41 < \kappa < 0,6$ = moderada; $0,61 < \kappa < 0,8$ = forte; e $0,81 < \kappa \leq 1$ = quase perfeita; e p-valor > 0,05 representando concordância puramente aleatória. Moda foi

utilizada para analisar estatisticamente os resultados enviados pelos três avaliadores, ou seja, foi considerada a classificação e a intensidade que ocorrem com maior frequência em cada gTSOF analisado dentro de cada cenário proposto. Em todas as análises valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

RESULTADOS

Os animais do grupo HCPD hipercortisolêmico compôs-se de 4 machos e 12 fêmeas, variando de 7 a 16 anos de idade ($10 \pm 2,9$ anos) e peso entre 2,5 e 20,5 kg ($8 \pm 4,9$ kg), enquanto o grupo HCPD normocortisolêmico apresentou-se exclusivamente por fêmeas caninas, variando de 9 a 12 anos de idade ($10,5 \pm 1,25$ anos) e peso entre 2,6 e 10 kg ($6 \pm 2,4$ kg). Dentre os 22 cães, 4 (18,2%) eram cães mestiços e 18 (81,8%) possuíam raças definidas, sendo estas Poodle (5), Shih Tzu (5), Dachshund (2), Yorkshire Terrier (2), Lhasa Apso (2), Schnnauzer (1) e Cocker Spaniel (1).

Em todos os cenários propostos, houve certo grau de concordância entre os avaliadores, conforme explicitado na Tabela 1.

Tabela 1. Tabela de grau de concordância entre os avaliadores nos cenários propostos (1, 2 e 3) e a significância estatística dos dados avaliados (p-valores).

CENÁRIOS	PACIENTES COM HCPD	κ	p-valor
1	Hipercortisolêmicos	0,043	0,767
	Normocortisolêmicos	0,379	0,039
2	Hipercortisolêmicos	0,556	0,000119
	Normocortisolêmicos	0,446	0,03
3	Hipercortisolêmicos	0,194	0,0501
	Normocortisolêmicos	0,339	0,0276

*Interpretação do coeficiente de kappa (κ): $\kappa < 0$ = insignificante; $0 < \kappa < 0,2$ = fraca; $0,21 < \kappa < 0,4$ = razoável; $0,41 < \kappa < 0,6$ = moderada; $0,61 < \kappa < 0,8$ = forte; e $0,81 < \kappa \leq 1$ = quase perfeita. P-valor $> 0,05$ significa concordância puramente aleatória.

Quando analisados os cenários propostos e os grupos estudados, o maior grau de concordância entre os avaliadores ocorreu quando os escores 0 e 1 foram agrupados e

considerados como “ausência de SOF” e os escores 2 e 3 como “presença de SOF” (cenário 2), sendo moderada tanto nos pacientes com HCPD hipercortisolêmicos, quanto nos normocortisolêmicos. Vale salientar que diante dos *p-valores*, a hipótese de que tais concordâncias pudessem ser puramente aleatórias foi excluída ($p\text{-valor} < 0,05$).

Concordâncias na classificação não aleatórias ($p < 0,05$) razoáveis ocorreram nos cães com HCPD normocortisolêmicos tanto quando se testou a hipótese de que há SGI (cenário 1), quanto quando foram levados em consideração, individualmente, os escores de classificação e intensidade de sangramento segundo a prancha de cores do gTSOF (cenário 3). O mesmo não foi observado nos pacientes caninos hipercortisolêmicos (cenários 1 e 3), cujas concordâncias na classificação resultaram fracas e meramente aleatórias ($p > 0,05$).

Quando os resultados foram analisados segundo os critérios do cenário 2, somente 17% dos cães portadores de HCPD normocortisolêmicos (1; $n=6$) e 25% dos cães hipercortisolêmicos (4; $n=16$) resultariam positivos para SOF ($p=0,6778$), enquanto quando analisados com vistas aos demais cenários (1 e 3), 67% dos cães normocortisolêmicos (4; $n=6$) e 94% cães hipercortisolêmicos (15; $n=16$) passariam a ser positivos para SOF ($p=0,0992$ e $p=0,2618$, respectivamente para os cenários 1 e 3); não sendo possível afirmar que o hipercortisolismo em si, esteja relacionado ao achado de sangramento oculto fecal em cães portadores de HCPD.

Por outro lado, quando “presença vs. ausência” de SOF foi avaliada segundo os critérios do cenário 2, ou seja, quando uma alta sensibilidade do gTSOF foi aventada e os escores 0 e 1 foram considerados genericamente como “ausência” e os escores 2 e 3 como “presença” de SOF, verificou-se que a proporção de animais com ausência de SOF (resultado negativo) foi significativamente superior a proporção de animais com presença de SOF (resultado positivo) tanto nos cães com HCPD hipercortisolêmicos, quanto nos normocortisolêmicos ($p=0,6778$), indicando não haver SOF em cães com HCPD.

DISCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo inédito avaliar as fezes de caninos portadores de hipercortisolismo pituitário-dependente (HCPD) por meio da única metodologia comercial acessível já utilizada em outros trabalhos (Crivellenti *et al.* 2017; Narita *et al.* 2007; Pierini *et al.* 2020) e em virtude de não existir teste padrão ouro para avaliação de sangramento oculto fecal para espécie canina.

Assim como relatado por demais colegas pesquisadores (Crivellenti *et al.* 2017; Pierini *et al.* 2020), atestamos tanto a facilidade, quanto a praticidade do uso do teste comercial a base do reagente guáiac para realização da pesquisa de SOF em cães, uma vez que nenhuma dificuldade foi encontrada na execução do gTSOF, nem no preparo das amostras fecais.

Diferentemente de outros trabalhos que utilizaram apenas um único avaliador para classificar o TSOF (Crivellenti *et al.* 2017; Narita *et al.* 2007; Pierini *et al.* 2020; Rudinsky *et al.* 2017), este trabalho teve o cuidado de ter seus dados analisados de maneira cega por três patologistas clínicos experientes, o que surpreendentemente resultou em uma alta variabilidade de classificações, alertando-nos para possíveis sub e superestimações nos resultados até então publicados utilizando o gTSOF e impossibilitando-nos de responder a principal questão investigada por este trabalho.

Ausência de SOF em cães com HCPD foi o resultado da análise que supôs haver baixa especificidade do gTSOF em detectar SOF clinicamente significativos, considerando o escore 1 (levemente positivo) também como negativo para SOF. Dados contidos na bula do kit comercial informam que o limite mínimo de detecção de SOF em amostras de fezes humanas é de gTSOF 10 mg de Hb/g de fezes, porém resultados ainda não publicados de nosso estudo piloto com gTSOF³ com amostras fecais caninas forjadas com quantidades predeterminadas de sangue, mostraram que o gTSOF apresenta capacidade de identificar quantidades de sangue tão

ínfimas quanto 1 mg de Hb/g fezes em cães. Interpretando clinicamente tais resultados, obtém-se que o gTSOF seria capaz de detectar perdas que variam de 55,5 a 83 uL de sangue/g de fezes em cães com valores de hemoglobina dentro da normalidade [12 a 18 g/dL, respectivamente (COSTA et al., 2023)]. A falta de referência sobre a significância de sangramentos ocultos fecais em cães não nos permite avaliar se tais perdas seriam relevantes, verdadeiramente oriundas de SGI ou meramente parte do processo de defecação normal, colocando em xeque sua importância clínica.

O fato de não existir padrão-ouro para detecção de SOF em cães, bem como por não ter havido forte concordância em nenhum dos cenários propostos e grupos avaliados, os resultados oriundos dos cenários 1 e 3, os quais consideraram o escore 0 como ausência e os demais escores (1, 2 e 3) como presença de SOF, não podemos assumir, como assinalado pelo cenário 2, que realmente não há SOF em cães com HCPD, nem que o hipercortisolismo não teria real capacidade de causar lesões significativas no TGI.

Embora tenha sido possível analisar os dados estatisticamente, cremos que este trabalho apresente algumas limitações. Diante da grande discrepância numérica dos grupos estudados, talvez uma maior amostragem do grupo controle negativo (cães com HCPD normocortisolêmicos) pudesse resultar em um desfecho diferente. Embora não acreditemos que a dieta possa ser um fator influenciador nos nossos resultados, alguns autores demonstram tal preocupação em suas pesquisas, principalmente em seres humanos (Van Dam *et al.* 2010). A grande parte da preocupação deve-se a ingestão de carne de origem animal, já que o gTSOF detecta qualquer molécula de hemoglobina (Kratochvil *et al.* 1971; Rudinsky *et al.* 2017). Em nosso trabalho, todos os animais alimentavam-se dietas comerciais variadas, nenhum deles recebia alimentos frescos como carne crua (alta presença de hemoglobina), dieta exclusivamente vegetariana (alta atividade peroxidase) ou isenta de fonte proteica. Além do mais, alimentos comerciais passam por um processo de extrusão, processo capaz de modificar

potencialmente as propriedades bioquímicas do alimento (Tran *et al.* 2008). Assim, indo mais adiante, mesmo se a dieta fosse um fator considerável, cremos que dada a homogeneidade da alimentação dos cães de ambos os grupos, ela influenciaria de maneira similar em todas as análises.

Não podemos deixar de apontar que o grupo HCPD hipercortisolêmico considerou animais não-tratados (recém-diagnosticados) e animais tratados com trilostano, mas descompensados (ainda hipercortisolêmicos). Embora ambos sejam hipercortisolêmicos – razão pela qual foram alocados no mesmo grupo, não temos como afirmar que o fármaco utilizado (trilostano) não poderia influenciar de maneira direta ou indireta os resultados do gTSOF. Levando isso em consideração, estudos futuros avaliando amostragem de cães recém-diagnosticados vs. tratados não-controlados vs. tratados controlados poderiam sanar tais dúvidas. Ademais, após analisados todos os aspectos de nosso trabalho, cremos que a inclusão de um quarto grupo, um controle positivo realizado por meio de amostras fecais de cães com HC adicionadas de quantidades conhecidas de sangue do próprio animal, auxiliaria demasiadamente na interpretação dos resultados.

Falha de associação entre a positividade do gTSOF e o aumento de concentração de sangue (20 mg Hb/kg) em amostras fecais, fizeram com que os autores de pesquisa semelhante à nossa também fizessem ressalvas quanto a interpretação do gTSOF (Pierini *et al.* 2020). Corroborando estas preocupações, verificamos que obteríamos resultados completamente antagônicos considerando e analisando os resultados diante dos cenários aqui propostos.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, não é possível afirmar que existe sangramento oculto fecal pelo método guáico em cães portadores de hipercortisolismo pituitário-dependente, sejam eles hipercortisolêmicos ou normocortisolêmicos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores ainda agradecem o Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU) em especial o Serviço de Endocrinologia HV-UFU pelos pacientes compartilhados e ao médico veterinário MV. Msc. Luciano Faria por ajudar nas confecções dos códigos aleatórios.

Declaração de interesse: Os autores indicaram que não tem afiliação ou envolvimento financeiro com qualquer organização ou entidade com um interesse financeiro em, ou em concorrência com o assunto ou materiais discutidos neste artigo.

REFERÊNCIAS

- Behrend, E.N., Kooistra, H.S., Nelson, R., *et al.* (2013) Consensus Statement: Canine Hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **27**, 1292–1304. <https://doi.org/10.1111/jvim.12192>
- Bennaim, M., Centola, S., Ramsey, I., *et al.* (2019) Clinical and Clinicopathological Features in Dogs with Uncomplicated Spontaneous Hyperadrenocorticism Diagnosed in Primary Care Practice (2013–2014). *Journal of the American Animal Hospital Association* **55**, 178–186. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6789>
- Crivellenti, L.Z., Borin-Crivellenti, S., Fertal, K.L., *et al.* (2017) Occult gastrointestinal bleeding is a common finding in dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Clinical Pathology* **46**, 132–137. <https://doi.org/10.1111/vcp.12461>
- European Society of Veterinary Endocrinology ESVE
<https://www.esve.org/alive/search.aspx> [accessed 1 November 2022]
- Filaretova, L., Podvigina, T. & Yarushkina, N. (2020) Physiological and Pharmacological

- Effects of Glucocorticoids on the Gastrointestinal Tract. *Current Pharmaceutical Design* **26**, 2962–2970. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200521142746>
- Filaretova, L., Podvigina, T., Bagaeva, T., *et al.* (2009) Dual action of glucocorticoid hormones on the gastric mucosa: How the gastroprotective action can be transformed to the ulcerogenic one. *Inflammopharmacology* **17**, 15–22. <https://doi.org/10.1007/s10787-008-8046-3>
- Kratochvil, J.F., Burris, R.H., Seikel, M.K., *et al.* (1971) Isolation and characterization of α -guaiaconic acid and the nature of guaiacum blue. *Phytochemistry* **10**, 2529–2531. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89901-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89901-X)
- Lemetayer, J. & Blois, S. (2018) Update on the use of trilostane in dogs. *Canadian Veterinary Journal* **59**, 397–407
- Matz, M.E. & Guilford, W.G. (2003) Laboratory procedures for the diagnosis of gastrointestinal tract diseases of dogs and cats. *New Zealand Veterinary Journal* **51**, 292–301. <https://doi.org/10.1080/00480169.2003.36383>
- Narita, T., Sato, R., Motoishi, K., *et al.* (2007) The interaction between orally administered non-steroidal anti-inflammatory drugs and prednisolone in healthy dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* **69**, 353–363. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.353>
- Narita, T., Tomizawa, N., Sato, R., *et al.* (2005) Effects of long-term oral administration of ketoprofen in clinically healthy beagle dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* **67**, 847–853. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.847>
- O'Neill, D.G., Scudder, C., Faire, J.M., *et al.* (2016) Epidemiology of hyperadrenocorticism among 210,824 dogs attending primary-care veterinary practices in the UK from 2009 to 2014. *Journal of Small Animal Practice* **57**, 365–373. <https://doi.org/10.1111/jsap.12523>
- OBScreen, H. (2021) HEXAGON OBScreen https://invitro.com.br/wp-content/uploads/2021/12/hexagon_obscreen.pdf
- Pierini, A., Bartoletti, F., Lubas, G., *et al.* (2020) The guaiac-based fecal occult blood test in healthy dogs: Evaluation of the effects of diet, and the ability of the test to detect fecal occult blood. *Veterinary Clinical Pathology* **49**, 71–77. <https://doi.org/10.1111/vcp.12829>

- Reinau, D., Schwenkglenks, M., Früh, M., *et al.* (2018) Glucocorticoids and the Risk of Peptic Ulcer Bleeding: Case–Control Analysis Based on Swiss Claims Data. *Drug Safety* **41**, 725–730. <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0645-3>
- Rice, J.E. & Ihle, S.L. (1994) Effects of diet on fecal occult blood testing in healthy dogs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire* **58**, 134–137
- Rudinsky, A.J., Guillaumin, J. & Gilor, C. (2017) Sensitivity of fecal occult blood testing in the cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **19**, 603–608. <https://doi.org/10.1177/1098612X16643752>
- Tran, Q.D., Hendriks, W.H. & Poel, A.F. van der (2008) Mini-review Effects of extrusion processing on nutrients in dry pet food. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**, 1487–1493. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3247>
- Van Dam, L., Kuipers, E.J. & Van Leerdam, M.E. (2010) Performance improvements of stool-based screening tests. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* **24**, 479–492. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.03.009>
- Wehner, A., Glöckner, S., Weiss, B., *et al.* (2021) Association between ACTH stimulation test results and clinical signs in dogs with hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Veterinary Journal* **276**, 0–5. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105740>