



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS
DE HORMÔNIOS TIREOIDIANOS POR
RADIOIMUNOENSAIO E QUIMIOLUMINESCÊNCIA
EM AMBOS OS SEXOS DE ARARA-VERMELHA (*Ara
chloropterus*) MANTIDAS EM CATIVEIRO**

KÁSSIA REGINA AGUIAR VIEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA – DF

FEVEREIRO/2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS
DE HORMÔNIOS TIREOIDIANOS POR
RADIOIMUNOENSAIO E QUIMIOLUMINESCÊNCIA
EM AMBOS OS SEXOS DE ARARA-VERMELHA (*Ara
chloropterus*) MANTIDAS EM CATIVEIRO**

VIEIRA, K. R. A.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO ISMAR SILVA SANTANA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 156/2018

BRASÍLIA – DF

FEVEREIRO/2019

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

VIEIRA, K. R. A. **Comparação das concentrações séricas de hormônios tireoidianos por radioimunoensaio e quimioluminescência em ambos os sexos de arara-vermelha (*Ara chloropterus*) mantidas em cativeiro.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019, 24p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Kássia Regina Aguiar

Comparação das concentrações séricas de hormônios tireoidianos por radioimunoensaio e quimioluminescência em ambos os sexos de arara-vermelha (*Ara chloropterus*) mantidas em cativeiro. / Kássia Regina Aguiar Vieira, orientação de Marcelo Ismar Silva Santana – Brasília, 2019. 24 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

1. Aves. 2. Hormônios da tireoide. 3. Imunoquimioluminescência.

I. Santana, M. I. S.

II. Doutor

CDD ou CDU
Agris/FAQ

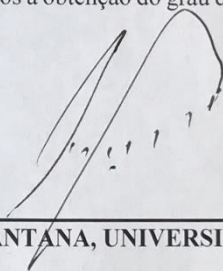
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES
SÉRICAS DE HORMÔNIOS TIREOIDEANOS POR
RADIOIMUNOENSAIO E
QUIMIOLUMINESCÊNCIA EM AMBOS OS SEXOS
DE ARARAS-VERMELHAS (ARA
CHLOROPTERUS) MANTIDAS EM CATIVEIRO**

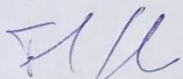
KÁSSIA REGINA AGUIAR VIEIRA

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Animal

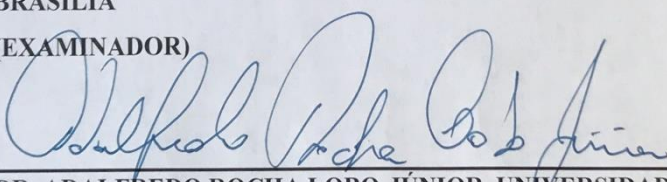
APROVADA POR:



DR. MARCELO ISMAR SILVA SANTANA, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
(ORIENTADOR)



DR. FABIANO JOSÉ FERREIRA DE SANTANA, UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA
(EXAMINADOR)



DR. ADALFREDO ROCHA LOBO-JÚNIOR, UNIVERSIDADE FEDERAL DOS
VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, CAMPUS UNAI
(EXAMINADOR)

BRASÍLIA – DF, 8 DE FEVEREIRO DE 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de Brasília, à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-graduação em Saúde Animal, pela oportunidade e aceitação.

Ao Decanato de Pós-Graduação e ao Programa de Demanda Social da CAPES, pois sem o incentivo financeiro através da bolsa, eu não teria conseguido realizar este trabalho.

À Itaipu Binacional pelo apoio financeiro para a realização dos exames hormonais e disponibilização de toda sua estrutura.

Agradeço ao Prof. Marcelo, por ter me acolhido no final da Graduação e prosseguido com este trabalho de Mestrado. Obrigada por estar sempre presente, aberto a dialogar, a corrigir com receptividade, a respeitar as condições de cada pessoa, a propor soluções práticas com calma e sabedoria, de forma responsável e justa. Meu aprendizado nesta parceria vai além de publicação e título, mas especialmente na inspiração do seu trabalho para o meu futuro na carreira acadêmica.

Aos colaboradores que fazem parte deste trabalho: Adalfredo, Mathias, Lígia, Zalmir, e todo o pessoal do Hospital Veterinário de Itaipu, do Laboratório Ambiental de Itaipu e do Parque das Aves, que auxiliaram nas coletas. Lena, João e Gabi: existe (muito) amor em Foz do Iguaçu.

Ao meu pai, que me propiciou as condições para que eu tivesse a oportunidade de estudar e o privilégio de escolher qual caminho seguir.

À minha mãe, a primeira a acreditar em todos os meus passos, antes mesmo de eu pensar em pisar. Obrigada por acreditar em mim e me dar forças, mesmo distante.

Minhas irmãs, sobrinh@s e amig@s: a existência de vocês torna a vida possível. Amo vocês.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
1 – INTRODUÇÃO.....	9
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE HORMÔNIOS TIREOIDIANOS POR RADIOIMUNOENSAIO E QUIMIOLUMINESCÊNCIA EM AMBOS OS SEXOS DE ARARA-VERMELHA (*Ara chloropterus*) MANTIDAS EM CATIVEIRO¹

Vieira, K. R. A.^{1*}; Cubas, Z. S.²; Dislich, M.³; Oliva, L. R.³; Lobo-Jr., A. R.⁴; Santana, M. I. S.¹

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - UnB - Brasília, DF

²Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, PR

³Parque das Aves Foz Tropicana, Foz do Iguaçu, PR

⁴Instituto de Ciências Agrárias - UFVJM - Unai, MG

*E-mail: kassia.rav@gmail.com; (61) 982208440

RESUMO

As concentrações séricas de hormônios tireoidianos obtidos por radioimunoensaio (RIA) e quimioluminescência (CLIA) foram comparadas usando 33 exemplares de arara-vermelha (*Ara chloropterus*), de ambos os sexos [machos (n=20) e fêmeas (n=13)], mantidas em cativeiro. Houve interação entre sexo e método somente sobre os valores de T3 livre. As concentrações de T3 livre nos machos foram maiores com o método RIA do que CLIA, enquanto nenhuma diferença foi encontrada entre os métodos nas fêmeas. Observou-se maiores concentrações de T3 livre nas fêmeas do que nos machos. O método influenciou as concentrações de T4 livre e TSH, que foram mais altas utilizando método RIA do que CLIA. As concentrações médias de T4 total, T4 livre, T3 total e T3 livre, pelos métodos de CLIA e RIA, respectivamente, foram: 6,36 e 6,19 nmol/l; 8,25 e 8,82 pmol/l; 5,11 e 5,08 pmol/l; e 1,59 e 1,56 nmol/l. As quantificações de um mesmo hormônio tireoidiano medidas pelos dois métodos foram mais parecidas para T3 livre ($r=+0,80$) e T4 livre ($r=+0,65$) e menos parecidas para T3 total ($r=+0,38$) e TSH ($r=-0,35$). Através dessas associações, foi possível encontrar equações para prever concentrações de hormônios tireoidianos no método RIA usando valores obtidos pelo método CLIA. Os resultados demonstraram que para T4 livre, T3 livre e T3 total o método CLIA é uma alternativa aplicável. O método CLIA para T4 total e os dois métodos para o TSH demonstraram não serem apropriados para a espécie em estudo.

Palavras-chave: psitacídeos, hormônios da tireoide, imunoquimioluminescência.

¹Texto formatado de acordo com as normas de publicação da revista Zoo Biology.

ABSTRACT

The serum concentrations of thyroid hormones obtained by radioimmunoassay (RIA) and chemiluminescence (CLIA) methods were compared using 33 specimens of macaw (*Ara chloropterus*) of both sexes [males (n = 20) and females (n = 13)] kept in captivity. There was interaction between sex and method only on free T3 values. Concentrations of free T3 in males were higher with RIA method than CLIA, while no differences were found in females. Higher concentrations of free T3 were observed in females than males using CLIA method, but not using RIA method. The method influenced concentrations of free T4 and TSH, which were higher using RIA method than CLIA. The mean concentrations of total T4, free T4, free T3 and total T3, by CLIA and RIA were, respectively: 6.36 and 6.19nmol/l; 8.25 and 8.82pmol/l; 5.11 and 5.08pmol/l; and 1.59 and 1.56nmol/l. Quantifications of the same thyroid hormone measured by the two methods were more similar for free T3 ($r = +0.80$) and free T4 ($r = +0.65$) and less similar for total T3 ($r = +0.38$) and TSH ($r = -0.35$). Through these associations, it was possible to find equations to predict concentrations of thyroid hormones in the RIA method using values obtained by the CLIA method. The results demonstrated that for free T4, free T3 and total T3 the CLIA method would be a reasonable alternative. And, finally, the CLIA method for total T4 and the two methods for TSH proved not to be appropriate for the species studied.

Keywords: psittacidae, immunochemiluminescence, thyroid hormones.

1 - INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior diversidade de psitacídeos (Galetti, Guimarães Jr. & Marsden, 2002), abrigando seis espécies de araras verdadeiras, dentre elas, a arara-vermelha (*Ara chloropterus*). A perda e a alteração de *habitat*, bem como o tráfico de fauna silvestre, colocaram muitas espécies de psitacídeos em risco de extinção (Murer, Didoné, Freitas & Lovato, 2018). Das 15 espécies do gênero *Ara*, nove estão na lista vermelha de animais ameaçados de extinção da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2018) e há evidências do declínio populacional da arara-vermelha (Birdlife, 2016). Espécies de psitacídeos são frequentemente mantidas em cativeiro, não apenas como animais de estimação, mas também em zoológicos e criatórios conservacionistas. O sucesso da criação dessas aves em cativeiro depende de boas práticas de manejo, controle e tratamento de doenças (Gomes et al., 2011).

A tireoide é uma glândula endócrina cuja função é produzir os hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), responsáveis pelo controle da taxa metabólica basal, além de serem importantes em vários processos nas aves, como reprodução, eclosão e muda de penas (Merryman & Buckles, 1998; McNabb, 2000). A estrutura anatômica e histológica, assim como os mecanismos fisiológicos de síntese e liberação dos hormônios, da glândula tireoide das aves são equivalentes à dos mamíferos (McNabb, 2000).

Evidências indicam que os psitacídeos são mais suscetíveis a desenvolver o bócio do que outras famílias de aves (Loukopoulos et al., 2015). Em um estudo sobre a hiperplasia de tireoide em diversas espécies de aves, as araras obtiveram a maior incidência de bócio hiperplásico (Schmidt & Reavill, 2002). Oglesbee (1992) confirmou um caso de hipotireoidismo em araracanga (*Ara macao*), bem como há vários outros casos de suspeita clínica reportados em psitacídeos, que associam o hipotireoidismo à anormalidades de penas em araras (Merryman & Buckles, 1998). Devido a essa susceptibilidade dos psitacídeos às doenças de tireoide, medições da concentração sérica dos hormônios tireoidianos se tornam importantes.

27 Os testes mais utilizados para a avaliação da função tireoidiana são aqueles que medem a
28 concentração dos hormônios tireoidianos no soro (Merryman & Buckles, 1998), como por exemplo, o
29 radioimunoensaio (RIA) e a quimioluminescência (CLIA) (Schachter, Nelson & Scott-Moncrieff, 2004;
30 Soldin, Soukhova, Janicic, Jonklaas & Soldin, 2005). No entanto, a maioria das técnicas de mensuração
31 de hormônios tireoidianos ainda não foi validada para as aves (Mcnabb, 2007). Apenas um teste de RIA
32 foi desenvolvido e validado para o uso em psitacídeos, mas ainda não está disponível para o uso
33 comercial (Orosz, Monks & Matos, 2016). Atualmente, o método mais comumente utilizado para
34 determinar os níveis de T4 e T3 total em aves é o RIA de fase sólida, desenvolvido para cães (Coat-a-
35 Count Canine kit, DPC, Los Angeles, CA), e que possui um limite mínimo de detecção relativamente
36 alto para detectar as baixas concentrações encontradas nas amostras de aves (Orosz et al., 2016), apesar
37 de ainda não ter sido validado para este grupo de aves (Greenacre & Jaques, 2011). O teste mais acurado
38 para a mensuração dos hormônios tireoidianos livres é espectrometria de massa, porém, ele é raramente
39 utilizado em aves devido à sua complexidade (Orosz et al., 2016). No caso do TSH aviário, não existem
40 anticorpos específicos para aves e, por essa razão, são utilizados testes RIA humanos (Mcnabb, 2007).

41 Devido ao RIA utilizar produtos radioativos, desenvolveram-se métodos alternativos
42 (Kemppainen & Birchfield, 2006), como o método CLIA, que é amplamente utilizado em humanos, por
43 ser simples, rápido, ter boa sensibilidade, longa vida útil e ampla aplicabilidade, sem gerar resíduos
44 radioativos e efeitos tóxicos dos reagentes (Lemos et al., 2015; Shamsian, Ghazvini, Sokhtanloo,
45 Moghaddam, & Vakili, 2016; Dudley, 2016). Este método foi validado com boa sensibilidade para a
46 dosagem de alguns dos hormônios tireoidianos em cães, gatos e equinos (Singh, Jiang, White, &
47 Spassova, 1997) e, desde então, se enquadra como um potencial substituto para o RIA (Solter & Farner,
48 2000, Vieira et al., 2010). Apesar de suas vantagens, o método CLIA ainda não foi validado para
49 mensuração de hormônios tireoidianos em aves (Vieira et al., 2018).

50 Neste estudo, buscou-se associações entre os métodos de RIA e da CLIA na mensuração de T4
51 total, T4 livre, T3 total, T3 livre e TSH em ambos os sexos de arara-vermelha (*Ara chloropterus*) e
52 determinou-se intervalos de referência para estes hormônios na espécie estudada.

53

2 - MATERIAL E MÉTODOS

54
55

2.1 - ANIMAIS E COLETA DO SORO

57 Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília
58 (protocolo nº 72/2017). Foram utilizadas 33 araras de cativeiro da espécie *Ara chloropterus* (arara-
59 vermelha), 20 machos e 13 fêmeas, previamente sexadas pela técnica de biologia molecular, adultas,
60 com diferentes idades e clinicamente saudáveis, condição estabelecida através da realização de exames
61 físicos (Doneley, Harrison & Lightfoot, 2006) e hematológicos (Vieira et al., 2018).

62 Do grupo selecionado, oito aves eram mantidas no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu
63 Binacional, 22 no Parque das Aves, e três no Zoológico Municipal Bosque Guarani Todas as instituições
64 estavam localizadas no município de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. As aves viviam em recintos
65 coletivos, com água *ad libitum* e eram alimentadas com ração, frutas frescas, verduras e legumes
66 diversos.

67 Com auxílio dos tratadores, os animais foram contidos fisicamente, para a pesagem e a punção
68 de 4 ml de sangue na veia jugular direita. O sangue coletado foi dividido em tubo com anticoagulante
69 (EDTA), para a realização de hemograma, e em tubo com gel ativador de coagulação, para obtenção de
70 soro.

71

2.2 - ANÁLISE LABORATÓRIAL

73 Os tubos, com ambas amostras de sangue, foram enviados ao Laboratório Ambiental da Itaipu
74 Binacional, para a realização de hemogramas e obtenção do soro plasmático (3000 rpm por cinco a dez
75 minutos). As amostras de soro foram acondicionadas em tubos Eppendorf® de 1,5 ml, congeladas a -20
76 °C e enviadas ao Laboratório Grupo São Camilo (Maringá, Paraná, Brasil) para a dosagem sérica de
77 hormônios tireoidianos (T4 total, T4 livre, T3 total, T3 livre e TSH). As determinações quantitativas dos
78 hormônios tireoidianos de cada animal foram realizadas pelos métodos de CLIA e RIA.

79

80 **2.3 - MÉTODO RIA**

81 Os kits de RIA (Count-a-Count®, Siemens Healthcare Diagnostics, USA) são ensaios de fase
82 sólida marcados com ^{125}I , designados para a dosagem quantitativa dos hormônios tireoidianos em soro
83 ou plasma. As moléculas de hormônio marcadas com ^{125}I competem por um período fixo de tempo com
84 as moléculas do hormônio da amostra do paciente para os sítios do anticorpo específico, em presença
85 de agentes bloqueadores das proteínas ligadoras dos hormônios tireoidianos. Após o período de
86 incubação, que nestes kits é de 60 minutos a 37°C , os tubos são decantados e a concentração do
87 hormônio é lida durante 1 minuto no leitor de radioatividade Gamma Count (Gamma C-12, Siemens
88 Healthcare Diagnostics, USA). Para a mensuração de T4 total e TSH, foram utilizados kits de uso
89 veterinário baseados em anticorpos caninos. Por não haver kits veterinários disponíveis para T4 livre,
90 T3 total e T3 livre, foram utilizados testes elaborados para humanos.

91 **2.4 - MÉTODO CLIA**

92 Para o método de CLIA, utilizou-se kits competitivos de fase sólida Immulite® da Siemens para
93 leitura do aparelho Immulite 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, USA). O kit é formado por
94 anticorpos específicos para o hormônio a ser testado e moléculas deste hormônio associadas a partículas
95 paramagnéticas na fase sólida. Quando estes elementos são misturados com o hormônio da amostra do
96 paciente, em um ciclo de incubação de 30 minutos, juntamente com os reagentes e estabilizadores,
97 ocorre ativação da reação de CLIA. O sistema detecta a quantidade de unidades relativas de luz emitidas
98 e apresenta os resultados. Para a mensuração de T4 total, T4 livre e TSH, usou-se os kits de uso
99 veterinário Immulite 1000 Canine. Por não haver kits Immulite veterinários comercialmente disponíveis
100 para mensuração de T3 total e T3 livre, usou-se os kits Immulite 1000 para humanos.

101 **2.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

102 A distribuição de frequência das araras-vermelhas de acordo com sexo (macho e fêmea) e
103 método (RIA e CLIA) foi inicialmente checada. Em seguida, análises de variância (ANOVAs) foram
104 realizadas para as variáveis segundo um delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas

105 subdivididas, no qual o efeito de sexo foi considerado a parcela e o efeito de método foi considerado a
 106 subparcela. Dessa forma, foram incluídos no modelo os efeitos fixos de sexo, método e suas interações,
 107 além dos efeitos aleatórios de origem e animal aninhado com sexo, e a covariável peso. Para considerar
 108 um efeito significativo, foi adotado um nível de probabilidade de 5% ou menor para o teste *F*. Uma
 109 análise descritiva também foi conduzida para conhecer o comportamento de todas as variáveis de acordo
 110 com os resultados das ANOVAs. Por fim, análises de correlação de *Pearson*, para os dados brutos e
 111 resíduos, e de regressão foram realizadas para buscar associações entre as variáveis mensuradas pelos
 112 dois métodos.

113 As análises de distribuição de frequência, variância, descritiva, correlação e regressão dos dados
 114 foram conduzidas usando respectivamente os procedimentos *FREQ*, *MIXED*, *MEANS*, *CORR* e *GLM*
 115 do software *Statistical Analysis System* (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; versão 9.2).

116

117 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

118

119 Devido ao plasma das 33 araras terem sido analisados por dois métodos diferentes, CLIA e RIA,
 120 o número de medições totalizou 66 avaliações, sendo 26 em fêmeas e 40 em machos (Tab. 1).

121 **Tabela 1.** Frequência absoluta e percentual de araras-vermelhas (*Ara chloropterus*) de acordo com o
 122 sexo e o método usado na determinação dos hormônios da tireoide.

123

Sexo	Método		Total
	CLIA	RIA	
Fêmea	13 (19,7%)	13 (19,7%)	26 (39,4%)
Macho	20 (30,3%)	20 (30,3%)	40 (60,6%)
Total	33 (50,0%)	33 (50,0%)	66 (100,0%)

124 CLIA: método de quimioluminescência; RIA: método de radioimunoensaio.

125

126 As araras amostradas estavam clinicamente saudáveis, com exames físicos e escores corporais
 127 normais. As médias de peso e condição corporal das aves deste estudo (Tab. 2) estão de acordo com os
 128 valores esperados para esta espécie (Carpenter, 2010). A média e o erro padrão das concentrações dos
 129 hormônios tireoidianos dosados também estão apresentados na Tab. 2. Houve uma interação entre sexo
 130 e método ($P < 0,05$), somente entre os valores de T3 livre (Fig. 1). Nenhuma diferença ($P > 0,05$) para os

131 demais hormônios tireoidianos foi encontrada entre os sexos. Por outro lado, o método influenciou
 132 ($P < 0,05$) as concentrações de T4 livre e TSH, que foram mais altas ($P < 0,05$) utilizando o método RIA
 133 do que o método CLIA.

134

135 **Tabela 2.** Efeito de sexo e método sobre as concentrações dos hormônios da tireoide em araras
 136 vermelhas (*Ara chloropterus*).

137

Variável	Sexo (S)		Método (M)		Fonte de variação		
	Fêmea	Macho	CLIA	RIA	S	M	S × M
Peso (kg)	1,28 (0,042)	1,22 (0,034)	-	-	0,2535	-	-
CC (escore)	2,88 (0,091)	2,78 (0,073)	-	-	0,3540	-	-
T ₃ livre (pmol/l)	5,33 (0,399)	4,86 (0,361)	5,11 (0,346)	5,08 (0,346)	0,1626	0,7954	0,0075
T ₃ total (nmol/l)	1,59 (0,064)	1,56 (0,051)	1,59 (0,048)	1,56 (0,048)	0,7377	0,5638	0,2208
T ₄ livre (pmol/l)	8,50 (0,452)	8,57 (0,363)	8,25 (0,318) ^b	8,82 (0,318) ^a	0,9117	0,0497	0,5990
T ₄ total (nmol/l)	6,21 (0,225)	6,34 (0,189)	6,36 (0,204)	6,19 (0,204)	0,5778	0,4473	0,5618
TSH (μUI/ml)	0,024 (0,0058)	0,024 (0,0052)	0,017 (0,0054) ^b	0,031 (0,0054) ^a	0,9836	0,0017	0,4879

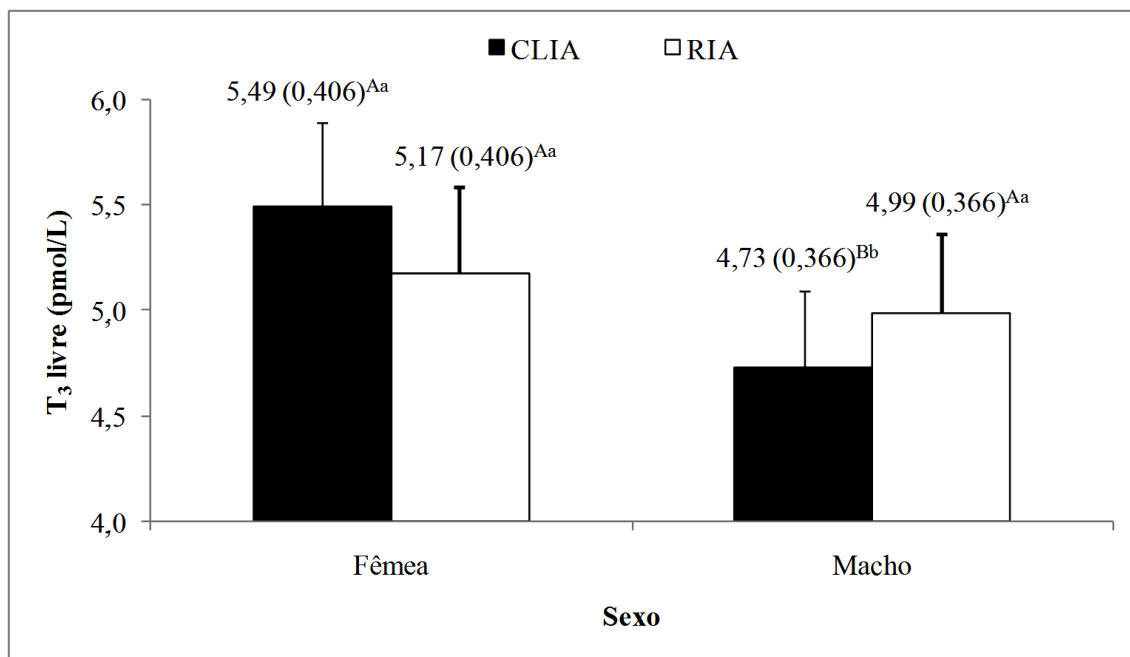
138 Média de quadrado mínimo (erro padrão). CLIA: método de quimioluminescência; RIA: método de
 139 radioimunoensaio; CC: condição corporal; TSH: hormônio estimulante da tireoide. ^{a,b}Médias seguidas
 140 por letras diferentes entre os métodos diferem a uma probabilidade de 5% pelo teste *F*.

141

142 A concentração de hormônios da tireoide no plasma sanguíneo das aves depende de vários
 143 fatores (Stojevic, Milinkovic-Tur, & Cucica, 2000), como disponibilidade de iodo, composição da dieta,
 144 idade, concentração das proteínas plasmáticas, fotoperíodo, temperatura e condição reprodutiva
 145 (Mcnabb, 2007; Orosz et al., 2016). Para reduzir a influência destes fatores, os animais amostrados
 146 consumiram uma dieta semelhante, e as coletas de sangue foram feitas na mesma semana e turno.

147 Detalhando a interação entre sexo e método, sobre os valores de T3 livre (Fig. 1), é possível
 148 verificar que as concentrações deste hormônio foram maiores nos machos ($P < 0,05$), quando utilizado o
 149 método RIA, enquanto que nenhuma diferença ($P > 0,05$) entre os métodos foi encontrada nas fêmeas.
 150 Também, observou-se maiores ($P < 0,05$) concentrações de T3 livre nas fêmeas do que nos machos,
 151 usando o método CLIA.

152



153
154
155
156
157
158
159

Figura 1. Interação entre sexo e método ($P=0,0075$) sobre as concentrações de T₃ livre em araras-vermelhas (*Ara chloropterus*). CLIA: método de quimioluminescência; RIA: método de radioimunoensaio; ^{a,b}Médias seguidas por diferentes letras minúsculas entre os métodos dentro de sexo diferem a uma probabilidade de 5% pelo teste *F*. ^{A,B}Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas entre os sexos dentro de método diferem a uma probabilidade de 5% pelo teste *F*.

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

Em aves, diferenças entre os sexos na função do eixo-hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano e nas concentrações de T₃ livre no sangue ainda não foram elucidadas (Vieira et al., 2018). Entretanto, verificou-se, em ratos, que machos castrados tratados com estrogênio e fêmeas não castradas apresentam maior densidade de receptores T₃ e atividade de desidase na hipófise do que os machos inteiros, sugerindo que o estrogênio aumenta o efeito de feedback negativo do hormônio tireoidiano na secreção de TSH (Donda, Reymond, Ray & Lemarchand-Beraud, 1990). Isso poderia ser uma possível explicação para os maiores valores de T₃ livre nas fêmeas do que nos machos, quando utilizado o método CLIA.

Na análise descritiva (Tab. 3), os valores de T₃ livre obtidos de fêmeas e machos, pelo método CLIA, variaram de 3,70 a 7,30 pmol/l, sendo essa variação maior do que a descrita por Eshratkhah, Zadeh, Forouzan, Parsa, & Ghalehkandi (2011), que utilizaram o mesmo método em galinhas (4,27 a 4,91 pmol/l).

174 **Tabela 3.** Análise descritiva para as concentrações dos hormônios da tireoide em araras-vermelhas (*Ara*
 175 *chloropterus*) de acordo com os resultados das análises de variância.

Variável	Sexo	Método	N	Média	DP	CV (%)	Mínimo	Máximo
Peso (kg)	Ambos	-	33	1,24	0,152	12,3	0,90	1,60
Condição corporal (escore)	Ambos	-	33	2,82	0,326	11,6	2,00	3,50
T ₃ livre (pmol/l)	Fêmea	CLIA	13	5,61	1,079	19,2	3,89	7,30
	Fêmea	RIA	13	5,30	0,897	16,9	3,75	6,16
	Macho	CLIA	20	4,91	0,834	17,0	3,70	6,65
	Macho	RIA	20	5,17	0,904	17,5	3,46	7,03
T ₃ total (nmol/l)	Ambos	Ambos	66	1,57	0,268	17,1	1,14	2,40
T ₄ livre (pmol/l)	Ambos	CLIA	33	8,25	1,889	22,9	4,50	12,21
	Ambos	RIA	33	8,84	1,649	18,7	5,02	11,97
T ₄ total (nmol/l)	Ambos	Ambos	66	6,36	0,878	13,8	4,25	9,27
TSH (μUI/ml)	Ambos	CLIA	33	0,014	0,0071	49,7	0,010	0,030
	Ambos	RIA	33	0,028	0,0243	86,2	0,010	0,120

176 N: número de observações; DP: desvio-padrão; CV: coeficiente de variação; CLIA: método de
 177 quimioluminescência; RIA: método de radioimunoensaio; TSH: hormônio estimulante da tireoide.
 178

179 O valor médio obtido de T3 total, para ambos os sexos e métodos, foi de 1,57 nmol/l (Tab. 3),
 180 valor próximo ao encontrado em papagaio-da-hispaniola (Brandão, Beaufreire, & Tully, 2014) e em
 181 galinhas (Stojevic et al., 2000), usando o método RIA, e próximo ao encontrado em galinhas, usando o
 182 método CLIA (Eshratkhah et al., 2011). Além disso, a concentração de T3 total teve um coeficiente de
 183 variação aceitável de 17,1% (Tab. 3). Esses resultados aliados à ausência de diferenças (P>0,05) nas
 184 concentrações de T3 total entre os métodos (Tab. 2), sugere a recomendação do método CLIA para
 185 quantificar esse hormônio, que apresenta vantagens quando comparado com o método RIA, tais como:
 186 praticidade, rapidez e baixo custo, além de não gerar resíduos radioativos e efeito tóxico dos reagentes
 187 (Lemos et al., 2015; Shamsian et al., 2016).

188 Valores de T4 livre variaram de 0,6 a 7,0 pmol/l em papagaio-de-hispaniola, usando o método
 189 de diálise de equilíbrio (Brandão et al., 2014) e, em araras-canindé, variaram de 1,41 a 5,92 pmol/l, pelo
 190 método de CLIA (Vieira et al., 2018). Até o momento, não há trabalhos publicados utilizando o método
 191 de RIA para medir T4 livre em psitacídeos, o que dificulta a comparação entre os métodos e
 192 compreensão da interferência do método nos resultados.

193 A média de T4 total mensurado em ambos os sexos, através dos dois métodos, foi de 6,36 nmol/l
194 (Tab. 3), o qual está próximo ao encontrado em *Ara ararauna* (Lothrop, Harrison, Schultz & Utteridge,
195 1986), em *Hispaniolan amazon* (Brandão et al., 2014) e em várias espécies de aves adultas (McNabb,
196 2000). O método RIA é o mais sensível para a determinação dos níveis de T4 total em aves e tem sido
197 utilizado desde o final da década de 70 (Mcnabb & Darras, 2015). Todavia, ainda não há teste RIA
198 comercialmente disponível para uso em aves.

199 Pelo método CLIA⁷, os valores de T4 total estavam abaixo da sensibilidade mínima do kit, que
200 é de 6,4 nmol/l. Por este motivo, os valores de T4 total medidos pelo método CLIA foram retirados da
201 análise de correlação e regressão. Estes resultados demonstraram que o método CLIA, realizado com
202 anticorpos para cães, utilizado neste trabalho, não é recomendado para quantificar T4 total em araras.
203 Vieira et. al (2018) mensurou T4 total em arara-canindé e obteve o intervalo de 3,86 a 32 nmol/l
204 utilizando um kit CLIA mais sensível, desenvolvido para uso em humanos, cujo limite mínimo de
205 detecção é de 3,9 nmol/l.

206 Por sua vez, o TSH foi o hormônio que teve o maior coeficiente de variação (Tab. 3).
207 Provavelmente, isso se deve aos valores quantificados, por ambos os testes utilizados, estarem próximos
208 do valor mínimo detectado pelos kits. A média do TSH, através do método CLIA, foi de 0,014 uUI/ml,
209 valor bem próximo ao da sensibilidade mínima do teste que é de 0,01 uUI/ml. Já, a média do TSH obtida
210 pelo método RIA foi de 0,028 uUI/ml, valor abaixo do limite inferior detectado pelo teste, que é de 0,03
211 uUI/ml. Esta constatação de que o limite mínimo detectável pelo kit RIA é mais alto do que do kit CLIA
212 pode explicar o motivo dos resultados obtidos terem sido mais altos utilizando o método RIA (Tab. 2).
213 O mesmo kit CLIA¹, utilizado neste trabalho, foi comparado com o kit RIA (Coat-a-count Canine TSH)³
214 em cães, e os valores de TSH também foram próximos ao da sensibilidade mínima (Marca, Loste, Orden,
215 González, & Marsellá, 2001).

216 O TSH não é facilmente medido em aves, porque ainda não foram desenvolvidos anticorpos
217 específicos para este grupo, sendo este o motivo para não existirem testes disponíveis para aves. O uso
218 de testes de RIA com anticorpos para TSH de mamíferos não são suficientemente sensíveis para medir
219 alterações deste hormônio no plasma de aves (Mcnabb, 2007). O teste de CLIA¹, utilizado neste trabalho,

220 apresentou maior sensibilidade para TSH do que o teste de RIA, uma vez que exibiu um menor
221 coeficiente de variação (Tab. 3). Esses resultados foram semelhantes ao obtido por Vieira et al. (2018),
222 que dosaram TSH em araras com um kit CLIA usado para humanos. Dessa forma, fica notório a
223 necessidade do desenvolvimento de testes para medição de TSH com anticorpos específicos para aves.

224 Correlações entre os resíduos das concentrações de um mesmo hormônio tireoidiano medido
225 pelos dois métodos também foram detectadas (Tab. 4). As quantificações pelos dois métodos são
226 semelhantes ($P < 0,05$) para T3 livre ($r = +0,80$) e T4 livre ($r = +0,65$), e menos correlatas ($P < 0,05$) para
227 T3 total ($r = +0,38$) e TSH ($r = -0,35$). Usando somente o método RIA, uma correlação ($P < 0,05$) também
228 foi observada entre os valores de T3 total e T4 livre ($r = -0,46$), indicando que os valores elevados de T3
229 total estão associados com os valores baixos de T4 livre, sendo o contrário também verdadeiro. A
230 concentração de T4 livre parece ter maior nível em amostras de aves quando comparadas às de
231 mamíferos, de forma que o uso de T4 livre para o auxílio no diagnóstico de doenças da tireoide em aves
232 tem sido proposto e investigado (Orosz et al., 2016). Além disso, a globulina ligadora de tiroxina (TBG),
233 que carrega cerca de 99,97% da T4 plasmática em humanos e nos cães, está ausente nas aves, de forma
234 que neste grupo, entre 50 e 80% dos hormônios são transportados pela albumina (Kaneko, 2008). Com
235 isso, os níveis de T4 livre em aves são menos afetados pelas concentrações de proteína e doenças
236 concomitantes (Scott-Moncrieff, 2010). Com relação ao T3 em aves, a afinidade e a capacidade das
237 proteínas plasmáticas de se unirem ao T3 é muito menor do que ao T4 (Wentworth & Ringer, 1986),
238 então o T3 livre sofre menor influência das proteínas carreadoras. A menor interferência das proteínas
239 plasmáticas nas concentrações séricas dos hormônios tireoidianos não-ligados a proteínas em aves, pode
240 explicar o melhor desempenho, e, maior correlação entre os métodos para T4 livre e T3 livre do que
241 para T4 total e T3 total.

242

243

244

245 **Tabela 4.** Análise de correlação de *Pearson* para as concentrações dos hormônios da tireoide medidos
 246 por métodos distintos em araras-vermelhas (*Ara chloropterus*).

Método/Variável	CLIA				RIA					
	T ₃ livre	T ₃ total	T ₄ livre	TSH	T ₃ livre	T ₃ total	T ₄ livre	T ₄ total	TSH	
CLIA	T ₃ livre		0,21	0,09	-0,02	0,78	0,10	-0,01	-0,13	-0,29
	T ₃ total	0,14		-0,03	-0,08	0,22	0,37	0,09	0,05	-0,16
	T ₄ livre	0,06	-0,01		0,35	0,04	-0,15	0,64	-0,19	-0,13
	TSH	0,08	-0,03	0,34		-0,09	0,18	0,35	-0,01	-0,26
RIA	T ₃ livre	0,80	0,18	0,02	-0,04		0,22	-0,15	-0,24	-0,36
	T ₃ total	0,18	0,38	-0,14	0,22	0,24		-0,47	0,09	-0,14
	T ₄ livre	-0,04	0,12	0,65	0,31	-0,16	-0,46		0,10	-0,01
	T ₄ total	-0,16	0,04	-0,22	0,02	-0,33	0,04	0,14		-0,09
	TSH	-0,30	-0,15	-0,14	-0,35	-0,31	-0,10	-0,04	0,00	

247 CLIA: método de quimioluminescência; RIA: método de radioimunoensaio; TSH: hormônio estimulante da
 248 tireoide. Coeficientes de correlação dos dados brutos acima da diagonal e dos resíduos abaixo da diagonal.
 249 Coeficientes de correlação em negrito são estatisticamente diferentes de zero ($P < 0,05$).

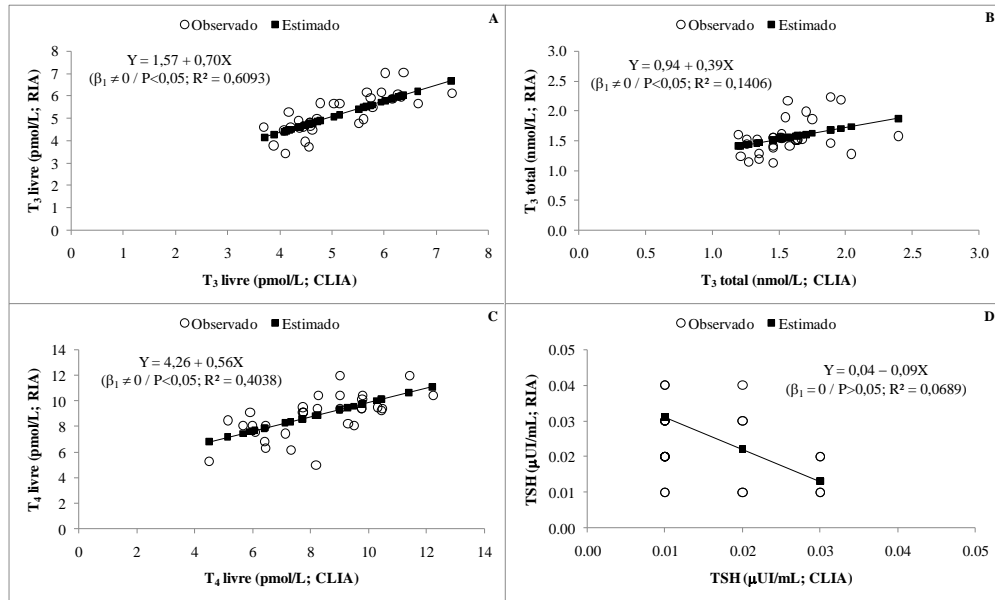
250

251 Outros trabalhos também compararam os métodos CLIA e RIA na mensuração dos hormônios da
 252 tireoide em soro de cães e gatos (Kemppainen & Birchfield, 2006). Em ambos os estudos, as correlações
 253 entre as concentrações de um mesmo hormônio tireoidiano medido pelos dois métodos também foram
 254 significativas e diretamente proporcionais, o que aponta o método CLIA como um potencial substituto
 255 para o método RIA (Vieira et al., 2010). Já a correlação negativa entre T4 livre e T3 total, usando o
 256 método RIA, pode estar relacionada com a deiodinação de T4 para T3, em que a maior parte dos
 257 hormônios tireoidianos secretada como T4 é revertida em T3 na circulação periférica (Klandorf, Sharp,
 258 & Duncan, 1978).

259 Uma vez que associações entre os dois métodos foram encontradas na quantificação de um mesmo
 260 hormônio tireoidiano (Tab. 4), buscou-se a melhor equação (linear ou quadrática) para prever as
 261 concentrações dos hormônios tireoidianos no método RIA usando valores obtidos pelo método CLIA
 262 (Fig. 2), que é de mais fácil aplicação. As melhores equações para os hormônios tireoidianos foram as
 263 lineares, porém a equação encontrada para TSH não é válida ($\beta_1=0$; $P > 0,05$). Concordando com os
 264 resultados de correlação, os dados melhores ajustados foram T3 livre ($R^2=0,6093$) e T4 livre
 265 ($R^2=0,4038$), na qual as equações encontradas foram respectivamente $Y=1,57+0,70X$ (Fig. 2A) e
 266 $Y=4,26+0,56X$ (Fig. 2C). Já, os menores ajustes dos dados foram observados para T3 total ($R^2=0,1406$)

267 e TSH ($R^2=0,0689$), que tiveram respectivamente as seguintes equações: $Y=0,94+0,39X$ (Fig. 2B) e
268 $Y=0,04-0,09X$ (Fig. 2D).

269



270

271 **Figura 2.** Análise de regressão para as concentrações de T₃ livre (A), T₃ total (B), T₄ livre (C) e TSH
272 (D) medidos por métodos distintos em araras-vermelhas (*Ara chloropterus*). CLIA: método de
273 quimioluminescência; RIA: método de radioimunoensaio; TSH: hormônio estimulante da tireoide.

274

275 Até o momento, não há testes para hormônios de tireoide específicos para aves disponíveis
276 comercialmente. Sabendo que as aves apresentam concentrações séricas de hormônios da tireoide muito
277 baixos (Mayer & Donelly, 2013), é importante desenvolver kits com boa sensibilidade e que detectem,
278 com precisão, concentrações baixas para os hormônios em questão. Quando comparado com o RIA, o
279 método CLIA aparece como boa opção na rotina clínica, por ser um método mais prático, rápido, barato,
280 e por não gerar resíduos radioativos e nem efeito tóxico (Lemos et al., 2015). Além dessas vantagens, o
281 método CLIA já foi validado com boa sensibilidade em cães, gatos e equinos (Singh et al., 1997).

282

283 Todavia, os valores do intervalo de referência devem ser utilizados com cuidado (Orosz et al.,
284 2016) e serem interpretados juntamente com outros indicadores, como sinais clínicos e outros testes
285 laboratoriais (Schmidt & Reavill, 2008). Deve-se considerar as variações relevantes entre diferentes
286 espécies e sexos. As dosagens de hormônios tireoidianos precisam fazer parte da rotina clínica de aves,
pois são variáveis fundamentais para um diagnóstico preciso. Os resultados deste estudo demonstram

287 correlação positiva para T4 livre, T3 livre e T3 total entre os kits utilizados de CLIA e RIA, com
288 coeficientes de variação baixos. Porém, a correlação para T3 total entre os dois métodos foi mais baixa
289 quando comparada com T4 livre e T3 livre. O TSH aviário medido pelos dois métodos e T4 total medido
290 pelo CLIA demonstraram não serem apropriados para a espécie em estudo.

291

292 ¹ Immulite Canine TSH, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

293 ² Coat-A-Count TSH, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

294 ³ Coat-A-Count Canine TSH, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

295 ⁴ Coat-A-Count Free T4, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

296 ⁵ Immulite 1000 Canine Free T4, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

297 ⁶ Coat-A-Count Canine T4, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

298 ⁷ Immulite 1000 Canine T4, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

299 ⁸ Coat-A-Count Free T3, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

300 ⁹ Immulite 1000 Free T3, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

301 ¹⁰ Coat-A-Count Canine Total T3, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

302 ¹¹ Immulite 1000 Total T3, Diagnostic Product Corp., Los Angeles, CA.

303

304 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

305

306 BirdLife International 2016. *Ara chloropterus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016.
307 <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685566A93080287.en>. Downloaded on 27
308 February 2019.

309 Brandão, J., Beaufre, H., & Tully, T. (2014). Free and Total Thyroid Hormones Reference Interval in
310 the Hispaniolan Amazon Parrot. *Proc Assoc Avian Vet.*, 2014-2029.

311 Carpenter J.W. (2010). *Formulário de Animais Exóticos*. São Paulo, Brasil: MedVet.

312 Donda, A., Reymond, F., Rey, F., & Lemarchand-Beraud, T. (1990). Sex steroids modulate the pituitary
313 parameters involved in the regulation of TSH secretion in the rat. *Acta Endocrinol*, 122, 577–584.

314 Doneley, B., Harrison, G. J., & Lightfoot, T. L. (2006). Physical Examination. In Harrison, G. J. (Ed)
315 *Clinical Avian Medicine* (pp. 153-212). Florida, USA: Spix Publishing.

316 Dudley, R. F. (2016). Chemiluminescence Immunoassay: An Alternative to RIA. *Lab Medicine*, 21,
317 216–222.

318 Eshratkhan, B., Zadeh, S. A., Forouzan, V., Parsa, P. A. A., & Ghalehkandi, J. G. (2011). Comparative
319 study on the determination of serum thyroid hormones by two methods of immunoassay in broiler
320 breeder poultry. *Comp Clin Path*, 20, 337-340.

321 Galetti, M., Guimarães Jr., P.R., & Marsden, S. J. (2002). Padrões de riqueza, risco de extinção e
322 conservação dos psitacídeos neotropicais. In Galetti, M. & Pizo, M.A (Eds.) *Ecologia e conservação de*
323 *psitacídeos no Brasil* (pp. 17-47). Belo Horizonte, Brasil: Melopsittacus Publicações Científicas.

324 Gomes, D. M., Silva, M. N., Silva, R. M. M., Dórea, R. D., Bastos, B. L., & Ayres, M. C. C. (2011).
325 Hemograma e bioquímica clínica sanguínea de araras (*Ara sp.*) mantidas em sítios ecológicos no estado
326 da Bahia. *Ci Anim Bras*, 12, 699-711.

327 Greenacre, C. B., & Jaques, J. (2011). TSH testing in birds using canine, bovine or human TSH, *Proc*
328 *Assoc Avian Vet Annu Conf*, 49.

329 IUCN 2018. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-2. <http://www.iucnredlist.org>.
330 Downloaded on 27 February 2019.

331 Kaneko, J. J. In Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (2008). *Clinical biochemistry of domestic*
332 *animals* (pp. 623-634). San Diego, USA: Academic Press.

333 Kempainen, R. J., & Birchfield, J. R. (2006). Measurement of total thyroxine concentration in serum
334 from dogs and cats by use of various methods. *Am J Vet Res*, 67, 259-265.

335 Klandorf, H., Sharp, P. J., & Duncan, I. J. H. (1978). Variations in levels of plasma thyroxine and
336 triiodothyronine in juvenile female chickens during 24- and 16- hr lighting cycles. *Gen Comp*
337 *Endocrinol*, 36, 238-243.

338 Lemos, G. G., Cunha, I. C. N., Conforti, V. A., Bastos, R., Quirino, C. R., & Faes, M. R. (2015).
339 Concentração dos metabólitos de estradiol e progesterona fecais no cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos*
340 *venaticus*) (Lund, 1842) pelos métodos de radioimunoensaio e quimioluminescência. *Rev Bras Reprod*
341 *Anim*, 39, 289-295.

342 Lothrop, C., Harrison, G. J., Schultz, D., & Utteridge, T. (1986). Miscellaneous diseases. In Harrison,
343 G. J., Harrison, L. R. (Ed.). *Clinical Avian Medicine and Surgery* (pp. 525-536). Philadelphia, USA:
344 W.B. Saunders Company.

345 Loukopoulos, P., Bautista, A. C., Puschner, B., Murphy, B., Crossley, B.M., Holser, I., Gomes, L., &
346 Uzal, F.A. (2015). An outbreak of thyroid hyperplasia (goiter) with high mortality in budgerigars
347 (*Melopsittacus undulatus*). *J Vet Diagn Invest*, 27, 18-24.

348 Marca, M. C., Loste, A., Orden, I., González, J.M., & Marsellá, J. A. (2001). Evaluation of canine serum
349 thyrotropin (TSH) concentration: comparison of three analytical procedures. *J Vet Diagn Invest*, 13,
350 106–110.

351 Marques, A. R. O. (2010). *Caracterização da estrutura genética populacional das araras vermelhas*
352 *Ara chloropterus e Ara macao (Psittaciformes, Aves)*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências,
353 Universidade de São Paulo, São Paulo.

354 Mayer, J., & Donnelly, T.M. (2013). *Clinical veterinary advisor birds and exotic pets*. St Louis, USA:
355 Elsevier Saunders.

356 McNabb, F. M. (2007). The Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis in Birds and Its Role in Bird
357 Development and Reproduction. *Crit Rev Toxicol*, 37, 163-193.

358 McNabb, F. M. A. (2000). Thyroids. In Whittow, G. C. (Ed.). *Sturkies avian physiology* (pp. 461-471).
359 San Diego, EUA: Academic Press.

360 McNabb, F. M. A., & Darras, V. M. (2015). Thyroids. In Scanes, C. (Ed.), *Sturkies avian physiology*
361 (pp. 535-547). San Diego, USA: Academic Press.

362 Merryman, J. I., & Buckles, E. L. (1998). The avian thyroid gland. Part two: a review of function and
363 pathophysiology. *J Avian Med Surg*, 12, 238–242.

364 Murer, L., Didoné, S.R., Freitas, A.B.B., & Lovato, M.. (2018). Investigação de Salmonella spp. em
365 Psittaciformes exóticos e nativos mantidos em cativeiro na região central do Rio Grande do Sul. *Arquivo*
366 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70, 815-822.

367 Oglesbee, B. L. (1992). Hypothyroidism in a scarlet macaw. *J Am Vet Med Assoc*, 201, 1599-1601.

368 Orosz, S. E., Monks, D., & Matos, R. (2016). Clinical endocrinology of the protein hormones. In Speer,
369 B. (Ed.). *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery* (pp. 379-382). Boston, USA: Elsevier.

370 Schachter, S., Nelson, R. W., & Scott-Moncrieff, C. (2004). Comparison of serum-free thyroxine
371 concentrations determined by standard equilibrium dialysis, modified equilibrium dialysis, and 5
372 radioimmunoassays in dogs. *J Vet Intern Med*, 18, 259–264.

373 Schmidt, R. & Reavill, D. (2008) The avian thyroid gland. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 11, 15-
374 23.

375 Schmidt, R., & Reavill, D. (2002). Thyroid Hyperplasia in Birds. *J Avian Med Surg*, 16, 111-114.

376 Scott-Moncrieff, J. C. (2010). Hypothyroidism. In Ettinger, S. J., Feldman, E.C. (Eds). *Textbook of*
377 *veterinary internal medicine* (pp. 1751-1761). St Louis, USA: Saunders.

378 Shamsian, A. A., Ghazvini, K., Sokhtanloo, M., Moghaddam, M. S. & Vakili, R. (2016). Which
379 quantitative method in determination of the thyroid hormone levels is more consistent with the clinical
380 symptom of the thyroid disorders? *Comp Clin Pathol*, 25, 101-106.

381 Singh, A. K., Jiang, Y., White, T., & Spassova, D. (1997). Validation of nonradioactive
382 chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in blood samples
383 obtained from dogs, cats, and horses. *J Vet Diagn Invest*, 9, 261–268.

384 Soldin, S. J., Soukhova, N., Janicic N., Jonklaas, J., & Soldin, O. P. (2005). The measurement of free
385 thyroxine by isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*, 358, 113–118.

386 Solter, P. F., & Farner, S. (2000). Correlation of two Nonradioactive Immunoassays to a
387 Radioimmunoassay Technique for Thyroxine Measurement in Equine Serum, *J Vet Diagn Invest*, 12,
388 51-56.

389 Stojevic, Z., Milinkovic-Tur, S., & Cucija, K. (2000). Changes in thyroid hormones concentrations in
390 chicken blood plasma during fattening. *Veterinarski Arhiv*, 70, 31-37.

- 391 Vieira, A., Castro, M., Freire, I., Coelho, M., Alencar, N., & Soares, A. (2010). Dosagem de tiroxina
392 total (T4) sérica pelo método de quimioluminescência em gatos clinicamente saudáveis. *Braz J Vet Res*
393 *Anim Sci*, 47, 224-230.
- 394 Vieira, K.R.A., Cubas, Z.S., Moraes, W., Dislich, M., Oliva, L.R., Lobo Júnior, A.R., & Santana, M. I.
395 S. (2018). Avaliação dos níveis séricos de hormônios tireoidianos em araras (*Ara spp.*) pelo método de
396 quimioluminescência. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 70, 174-180.
- 397 Wentworth, B. C. & Ringer, R. K. (1986). In Sturkie, P. D. (Ed.). *Sturkie's avian physiology* (pp. 452-
398 465). New York, USA: Springer-Verlag.
- 399 Witherspoon, R., El Shami, A. S., Shuler, S. E., Neely, H., Sonnemaker, R. Gilbert, S. S., & Alyea, K.
400 (1988). Chemically blocked analog assays for free thyronines. *Clin Chem*, 34, 9-23.