



**DOCUMENTO COM
CONFIDENCIALIDADE**

**Caxias do Sul
2025**

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

Karina Weege

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VITAMINA D NO
HIPERCORTISOLISMO CANINO

Caxias do Sul

2025

Karina Weege

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VITAMINA D NO
HIPERCORTISOLISMO CANINO**

Dissertação apresentada à Universidade de
Caxias do Sul - Programa de Pós-Graduação em
Saúde Animal, para obtenção do Título de
Mestre em Saúde Animal.

Área de Concentração: Ciências Agrárias

Orientadora:

Profa. Dra. Karina Affeldt Guterres

Caxias do Sul

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

W394a Weege, Karina

Avaliação dos níveis de vitamina D no hipercortisolismo canino [recurso eletrônico] / Karina Weege. – 2025.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, 2025.

Orientação: Karina Affeldt Guterres.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Cães - Doenças. 2. Endocrinologia veterinária. 3. Córtex suprarrenal - Doenças. 4. Vitamina D - Metabolismo. 5. Bioquímica clínica veterinária. 6. Medicina veterinária. I. Guterres, Karina Affeldt, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 591.1:636.7

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

Karina Weege

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VITAMINA D NO
HIPERCORTISOLISMO CANINO**

Dissertação apresentada à Universidade de Caxias do Sul - Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, para obtenção do Título de Mestre em Saúde Animal.

Área de Concentração: Ciências Agrárias

Orientadora:

Profa. Dra. Karina Affeldt Guterres

Aprovado em 24/10/2025

Banca Examinadora

Profa. MSc. Manoela Maria Bianchi

Universidade de Caxias do Sul

Prof. MSc. Gustavo Brambatti

Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Weslei de Oliveira Santana

Centro Universitário da Serra Gaúcha (FSG)

Dedicatória

À minha família, razão de todo o meu esforço.

Agradecimentos

Há momentos na vida em que as palavras parecem insuficientes para expressar a profundidade da gratidão que habita nosso coração. Este é um desses momentos. Ao encerrar esta etapa tão importante da minha jornada acadêmica, sinto-me envolvida por uma emoção que supera qualquer conquista individual – a certeza de que nada disso seria possível sem os seres extraordinários que iluminaram meu caminho.

Primeiramente, agradeço a Deus, fonte inesgotável de força e sabedoria, pelas vitórias derramadas sobre minha vida e pelas vitórias conquistadas. Em cada desafio enfrentado, em cada momento de incerteza, Sua presença foi meu alicerce, transformando obstáculos em oportunidades de crescimento e aprendizado.

Aos meus pais, Alex (*in memoriam*) e Marilene, dedico minha mais profunda gratidão. Pai, mesmo que fisicamente ausente, sua presença ecoa em cada decisão que tomo, em cada valor que carrega. Você me ensinou que o conhecimento é o único tesouro que ninguém pode nos tirar. Mãe, sua força inabalável e amor incondicional foram os pilares que sustentaram todos os meus sonhos. As oportunidades que vocês me proporcionaram e os ensinamentos que plantaram em meu coração ao longo de toda a minha vida são as sementes que hoje florescem nesta conquista.

Ao meu companheiro Rodrigo, meu porto seguro e minha fonte de coragem. Seu apoio incansável, seu incentivo nos momentos de desânimo e o amor que oferece como base sólida para que eu possa seguir em frente foram fundamentais para que eu chegue até aqui. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma duvidava, por transformar cada "não posso" em "vou conseguir".

Aos meus filhos amados, Maria Eduarda, Isabela e Arthur, peço desculpas pelas ausências de necessidade e agradeço imensamente pela compreensão e apoio nos momentos em que precisei estar focada nesta jornada. Vocês são minha maior motivação, meu amor mais puro e incondicional. Que esta conquista sirva de exemplo de que, com determinação e perseverança, todos os sonhos são possíveis. Amo vocês além das palavras.

À Marina, minha mentora e anjo da guarda acadêmica, não há palavras que expressem a minha gratidão. Você nunca soltou minha mão, mesmo quando o caminho parecia impossível. Acreditou no meu potencial quando eu mesma duvidei, iluminou meus passos quando a escuridão da incerteza tomou conta. Sua generosidade em compartilhar conhecimento e sua fé inabalável em minha capacidade foram os combustíveis que alimentaram minha determinação.

À professora Karina, minha orientadora, agradeço por aceitar caminhar comigo nesta jornada desafiadora e transformadora. Sua sabedoria, paciência e dedicação foram essenciais para que este trabalho se tornasse realidade. Obrigada por me guiar com mão firme e coração generoso através dos meandros da pesquisa científica.

E, por fim, mas não menos importante, agradeço a cada cão e gato que passou pela minha vida – vocês, seres de luz pura e amor incondicional, foram minha maior inspiração para escolher a endocrinologia veterinária. Cada olhar confiante, cada recuperação testemunhada, cada vida tocada me motivou a servir melhor a cada dia. Vocês me ensinaram que a medicina veterinária é muito mais que uma profissão – é um chamado do coração para cuidar daqueles que não podem falar por si mesmos, mas que se comunicam através do amor mais sincero que existe.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio que tornou possível a realização deste trabalho - Código de Financiamento 001, importante para meu crescimento e desenvolvimento como pesquisadora.

Esta dissertação não é apenas minha conquista, mas de todos vocês que, de alguma forma, desenvolveram para que ela se tornasse realidade. Carrego comigo, em cada página escrita, um pedacinho do amor, da sabedoria e da força que recebi de cada um de vocês.

Com o coração transbordando de gratidão e amor.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)

Resumo

O hipercortisolismo (HAC) canino é uma das endocrinopatias mais prevalentes em cães, apresenta evolução crônica e está associado a múltiplas alterações clínicas e metabólicas. A vitamina D desempenha papel relevante na homeostase mineral, óssea e metabólica, e sua deficiência tem sido relacionada a piores desfechos em diferentes espécies; contudo, sua relevância no contexto do HAC canino ainda permanece pouco explorada. Este estudo teve como objetivo avaliar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) em cães com HAC, comparando-os aos de cães saudáveis e investigando sua relação com parâmetros clínico-laboratoriais. Foram avaliados 20 cães, distribuídos igualmente entre grupo controle (n = 10) e grupo HAC (n = 10), submetidos a exame clínico, exames laboratoriais e dosagem sérica de 25(OH)D. Os cães com HAC apresentaram concentrações significativamente menores de 25(OH)D em relação aos controles [61,4 ng/mL (56,0–75,2) vs. 92,0 ng/mL (85,4–98,5); p = 0,024]. A maioria dos animais avaliados apresentou concentrações compatíveis com insuficiência de vitamina D; entretanto, a distribuição categórica do *status* de vitamina D não diferiu significativamente entre os grupos (p = 0,587). Entre os parâmetros bioquímicos, os triglicerídeos foram significativamente mais elevados no grupo HAC [137,0 mg/dL (101,0–321,0) vs. 59,0 mg/dL (52,0–79,0); p = 0,004] e apresentaram correlação negativa com os níveis séricos de 25(OH)D ($\rho = -0,502$; p = 0,040). Na regressão linear múltipla, o grupo clínico e o colesterol total associaram-se significativamente aos níveis de 25(OH)D, com $R^2 = 0,412$. A análise de componentes principais revelou um eixo bioquímico envolvendo 25(OH)D, triglicerídeos e ALT, responsável por 64,9% da variância total, embora sem discriminação clara entre os grupos. Conclui-se que cães com HAC apresentam menores níveis séricos de 25(OH)D em comparação a cães saudáveis, em um contexto de alterações metabólicas associadas, especialmente relacionadas ao perfil lipídico. Embora não seja possível estabelecer causalidade, os achados sugerem que a avaliação da 25(OH)D pode contribuir como ferramenta complementar no acompanhamento desses pacientes. Estudos longitudinais, com amostras maiores e maior controle de fatores de confusão, são necessários para esclarecer o papel da vitamina D no HAC canino e investigar possíveis efeitos da suplementação sobre parâmetros clínicos, bioquímicos e metabólicos.

Palavras-chave: Hipercortisolismo canino; 25-hidroxivitamina D; Vitamina D; Triglicerídeos; Dislipidemia.

Abstract

Canine hypercortisolism (HAC) is one of the most prevalent endocrinopathies in dogs, with a chronic course and multiple clinical and metabolic alterations. Vitamin D plays an important role in mineral, bone, and metabolic homeostasis, and its deficiency has been associated with adverse outcomes in different species; however, its relevance in the context of canine HAC remains poorly explored. This study aimed to evaluate serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) in dogs with HAC, comparing them with healthy dogs and investigating their relationship with clinical and laboratory parameters. Twenty dogs were evaluated, equally distributed between the control group (n = 10) and the HAC group (n = 10), and were submitted to clinical examination, laboratory testing, and serum 25(OH)D measurement. Dogs with HAC showed significantly lower 25(OH)D concentrations than controls [61.4 ng/mL (56.0–75.2) vs. 92.0 ng/mL (85.4–98.5); p = 0.024]. Most animals presented concentrations compatible with vitamin D insufficiency; however, the categorical distribution of vitamin D status did not differ significantly between groups (p = 0.587). Among the biochemical parameters, triglyceride levels were significantly higher in the HAC group [137.0 mg/dL (101.0–321.0) vs. 59.0 mg/dL (52.0–79.0); p = 0.004] and showed a negative correlation with serum 25(OH)D levels ($\rho = -0.502$; p = 0.040). In the multiple linear regression model, clinical group and total cholesterol were significantly associated with 25(OH)D levels, with an R² of 0.412. Principal component analysis revealed a biochemical axis involving 25(OH)D, triglycerides, and ALT, accounting for 64.9% of the total variance, although without clear discrimination between groups. In conclusion, dogs with HAC present lower serum 25(OH)D levels than healthy dogs, in a context of associated metabolic alterations, especially related to the lipid profile. Although causality cannot be established, these findings suggest that 25(OH)D assessment may contribute as a complementary tool in the monitoring of these patients. Longitudinal studies with larger samples and greater control of confounding factors are needed to clarify the role of vitamin D in canine HAC and to investigate the possible effects of supplementation on clinical, biochemical, and metabolic parameters.

Keywords: Canine hypercortisolism; 25-hydroxyvitamin D; Vitamin D; Triglycerides; Dyslipidemia.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. HIPÓTESE.....	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. REVISÃO DA LITERATURA	17
4.1 Hiper cortisolismo	17
4.2 Vitamina D	19
5. METODOLOGIA.....	23
5.1 População do estudo	23
5.2 Tamanho amostral	23
5.3 Exame clínico	24
5.4 Exames laboratoriais de rotina	24
5.5 Análise dos níveis de 25(OH)D	24
5.6 Análises estatísticas	24
5.7 Análise ética	25
6. RESULTADOS	26
6.1 Caracterização da amostra	26
6.2 Parâmetros laboratoriais de rotina	27
6.3 Comparação dos níveis séricos de 25(OH)D entre categorias de dose de trilostano ...	28
6.4 Comparação dos grupos quanto à concentração de 25(OH)D.....	29
6.5 Análises exploratórias de associação e predição	30
6.5.1 Correlações entre variáveis bioquímicas	30
6.5.2 Modelos de regressão para predição de níveis séricos de 25(OH)D	30
6.5.3 Análise de Componentes Principais (PCA) e agrupamentos.....	31
7. DISCUSSÃO	33
8. CONCLUSÕES.....	39
9. REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	46
ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	46
ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	47
APÊNDICE A – Tabela Suplementar S1	49

Lista de tabelas

Tabela 1. Características demográficas dos cães incluídos nos grupos controle e HAC	26
Tabela 2. Parâmetros clínico-laboratoriais com distribuição não normal entre cães com HAC e grupo controle	28
Tabela 3. Parâmetros clínico-laboratoriais com distribuição normal entre cães com HAC e grupo controle	28
Tabela 4. Distribuição dos cães segundo o <i>status</i> de vitamina D nos grupos controle e HAC	30

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

1,25(OH)₂D	1,25-diidroxivitamina D
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
24,25-DHCC	24,25-diidroxivitamina D
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ALT	Alanina aminotransferase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DBP	Proteína de ligação da vitamina D
DP	Desvio padrão
GH	Hormônio do crescimento
HAC	Hipercortisolismo
IQR	Intervalo interquartil
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
PCA	Análise de Componentes Principais
PTH	Hormônio da paratireóide
UCS	Universidade de Caxias do Sul
UV	Radiação ultravioleta
VDR	Receptor de vitamina D

1. INTRODUÇÃO

A vitamina D é reconhecida por seu papel essencial na regulação do metabolismo ósseo e mineral, sendo um precursor hormonal com ação em múltiplos sistemas fisiológicos. Sua forma circulante, a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D), é amplamente utilizada como marcador para avaliar o *status* de vitamina D, por apresentar maior estabilidade sérica e refletir de forma mais adequada a disponibilidade sistêmica. Embora o calcitriol (1,25-diidroxivitamina D) seja a forma biologicamente ativa, seus níveis séricos são rigidamente regulados por mecanismos homeostáticos, o que limita seu uso como indicador clínico de hipovitaminose D (Christakos *et al.*, 2016; Bikle; Schwartz, 2019; Kurzbard; Backus; Yu, 2021).

Na medicina veterinária, a deficiência de vitamina D tem sido associada a diversas patologias, incluindo distúrbios endócrinos, imunológicos, inflamatórios e cardiovasculares. Nos cães, uma das endocrinopatias mais prevalentes é o hipercortisolismo (também conhecido como síndrome de Cushing), caracterizado pela produção excessiva de cortisol, com consequências metabólicas importantes como intolerância à glicose, obesidade, dislipidemia, atrofia muscular e hipertensão (Rijnberk; Kooistra, 2010; Corbee, 2020).

Dentre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no hipercortisolismo, destaca-se o impacto do excesso de cortisol sobre o metabolismo hepático e lipídico, o que pode influenciar negativamente a biodisponibilidade da vitamina D. Em humanos, essa correlação já está bem documentada. Um estudo de Guarnotta *et al.* (2022) demonstrou que 52% dos pacientes com doença de Cushing apresentavam deficiência de vitamina D, com níveis séricos de 25(OH)D significativamente inferiores aos dos indivíduos saudáveis. Além disso, os autores sugerem que a hipovitaminose pode agravar comorbidades associadas, como diabetes mellitus, dislipidemia e doenças cardiovasculares.

Nos cães, essa associação ainda é pouco explorada. A espécie apresenta particularidades metabólicas que a tornam mais vulnerável à deficiência da vitamina D, uma vez que não realiza síntese cutânea por exposição solar, dependendo exclusivamente da dieta para manter seus níveis (Kurzbard; Backus; Yu, 2021). Essa dependência nutricional, aliada a alterações metabólicas típicas do hipercortisolismo, como disfunções hepáticas, absorção intestinal prejudicada e redistribuição tecidual, pode contribuir para a ocorrência de hipovitaminose D em pacientes com essa endocrinopatia.

Embora alguns estudos em cães com hipercortisolismo tenham sugerido alterações nos níveis de vitamina D, os resultados ainda são inconclusivos e divergentes, especialmente no que diz respeito à correlação com sintomas clínicos, alterações laboratoriais e gravidade do

quadro (Corbee *et al.*, 2012; Mooney *et al.*, 2020). Ainda existem lacunas sobre o real impacto da hipovitaminose D na progressão da doença e sobre o potencial benefício da suplementação como estratégia terapêutica.

Kurzbard, Backus e Yu (2021) demonstraram que a administração de 25-hidroxicalciferol (HyD®) foi capaz de aumentar de forma significativa e sustentada os níveis séricos de 25(OH)D em cães, quando comparada à suplementação tradicional com vitamina D3. Esse achado indica que a escolha do tipo de suplemento, bem como o estado clínico do animal, são fatores relevantes para a efetividade da intervenção.

Diante disso, investigar os níveis de 25(OH)D em cães com hipercortisolismo torna-se fundamental para aprofundar a compreensão sobre a relação entre essa endocrinopatia e o metabolismo da vitamina D. Este estudo busca responder à seguinte pergunta: cães com hipercortisolismo apresentam níveis séricos reduzidos de 25(OH)D em comparação a cães saudáveis, e esses níveis se associam a parâmetros clínico-laboratoriais relacionados à condição?

2. HIPÓTESE

Cães com hipercortisolismo apresentam níveis séricos reduzidos de 25(OH)D em comparação a cães saudáveis, e essa redução está associada a alterações clínico-laboratoriais relacionadas à condição.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis séricos de 25(OH)D em cães com hipercortisolismo, comparando-os aos de cães saudáveis e explorando sua relação com parâmetros clínico-laboratoriais.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar clinicamente os cães com e sem hipercortisolismo, a partir de dados de prontuários, exame clínico e exames laboratoriais de rotina.
- Analisar os níveis séricos de 25(OH)D dos cães com e sem hipercortisolismo, a partir de amostras de sangue periférico avaliadas por imunoensaio de micropartículas paramagnéticas.
- Comparar os níveis séricos e o *status* de 25(OH)D entre cães com e sem hipercortisolismo por meio de análises estatísticas apropriadas.
- Investigar associações entre os níveis séricos de 25(OH)D e parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo lipídico, hepático e renal dos cães avaliados.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Hiper cortisolismo

O hiper cortisolismo (HAC) canino, também denominado hiperadrenocorticismo ou síndrome de Cushing, é reconhecido como uma das endocrinopatias mais prevalentes em cães, sobretudo em animais de meia-idade e idosos. A enfermidade caracteriza-se pela exposição crônica a concentrações excessivas de cortisol, seja por produção endógena exacerbada ou por administração exógena de glicocorticóides. Em virtude da amplitude de efeitos metabólicos e sistêmicos exercidos pelos glicocorticóides, trata-se de uma condição clínica de grande impacto na qualidade de vida e na longevidade dos animais (Sanders *et al.*, 2021; Bennaim *et al.*, 2019).

Do ponto de vista fisiopatológico, o HAC endógeno pode ter duas origens principais: hipofisária ou adrenal. O HAC hipofisário (HAC-H), também conhecido como doença de Cushing, responde por aproximadamente 80 a 85% dos casos relatados (Peterson, 2007). Contudo, estudos mais recentes, especialmente aqueles baseados em coortes de grande escala, indicam que essa proporção pode ser variável, em alguns cenários alcançando valores inferiores (Jaffey *et al.*, 2020). Nessa forma, a hipófise anterior apresenta adenomas corticotróficos que secretam hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) de forma autônoma e resistente ao mecanismo de retroalimentação negativa promovido pelo cortisol. Essa hiperestimulação resulta em hiperplasia bilateral do córtex adrenal e consequente hipersecreção de cortisol endógeno (Teshima *et al.*, 2015).

O HAC adrenal (HAC-A), por sua vez, representa de 15 a 20% dos casos e é causado por neoplasias adrenocorticais funcionais, que podem ser adenomas ou carcinomas. Essas lesões secretam cortisol de forma independente da regulação hipofisária, promovendo supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Como consequência, ocorre redução do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do ACTH, levando à atrofia da adrenal contralateral, alteração que pode ser detectada por exames de imagem como ultrassonografia abdominal e tomografia computadorizada (Rodríguez Piñeiro *et al.*, 2011). Em cães, a apresentação unilateral é a mais comum, embora casos bilaterais sejam descritos.

Além das formas espontâneas, deve-se considerar o HAC iatrogênico, decorrente da administração prolongada ou em doses elevadas de glicocorticóides exógenos. Essa condição leva à supressão crônica do CRH e do ACTH, com consequente atrofia adrenocortical bilateral. Clinicamente, os sinais não diferem substancialmente das formas endógenas, mas o histórico de uso de corticosteróides é determinante para a suspeita diagnóstica (Peterson, 2007).

Os sinais clínicos associados ao HAC são diversos e frequentemente inespecíficos. Os mais comuns incluem poliúria, polidipsia, polifagia, obesidade abdominal, alopecia simétrica, alterações cutâneas, fraqueza muscular e intolerância ao calor. Além disso, a doença pode predispor a complicações secundárias de grande relevância clínica, como hipertensão arterial, pancreatite, diabetes mellitus, hepatopatia vacuolar e eventos tromboembólicos, todos relacionados ao excesso crônico de glicocorticóides (Feldman *et al.*, 2015). Essa multiplicidade de manifestações clínicas, somada à sobreposição com outras enfermidades, frequentemente dificulta o diagnóstico inicial.

O diagnóstico do HAC exige abordagem multimodal. A avaliação laboratorial básica, incluindo hemograma, bioquímica sérica e urinálise, fornece indícios inespecíficos, mas que orientam a investigação. Exames de imagem, como ultrassonografia abdominal, contribuem para a detecção de alterações nas adrenais, enquanto métodos mais avançados, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, têm papel importante na identificação de adenomas hipofisários e na diferenciação entre formas hipofisárias e adrenais (Nelson; Couto, 2006). No entanto, a confirmação diagnóstica depende de testes hormonais específicos, sendo o teste de supressão com baixa dose de dexametasona amplamente reconhecido como padrão-ouro (Schäfer *et al.*, 2023). O teste de estimulação com ACTH também é empregado, especialmente no monitoramento terapêutico, embora sua sensibilidade diagnóstica seja inferior.

No que diz respeito ao tratamento, a abordagem ideal depende da etiologia subjacente. Em cães com adenomas hipofisários secretores de ACTH, opções como a hipofisectomia transesfenoidal e a radioterapia têm sido descritas como modalidades eficazes, promovendo remissão clínica em muitos casos (Sanders; Kooistra; Galac, 2018). Todavia, tais terapias apresentam limitações relacionadas à complexidade técnica, à disponibilidade restrita de centros especializados e aos riscos anestésicos e cirúrgicos. Para os casos de neoplasias adrenais, a adrenalectomia unilateral é considerada o tratamento de escolha. Embora se trate de um procedimento de alto risco, quando realizado com sucesso pode proporcionar melhora clínica significativa e sobrevida prolongada (Sanders; Kooistra; Galac, 2018).

Na prática clínica cotidiana, o tratamento farmacológico é o mais amplamente utilizado, sobretudo pelo seu caráter menos invasivo. O trilostano consolidou-se como o fármaco de eleição para o manejo do HAC espontâneo. Sua ação ocorre pela inibição competitiva da enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase, reduzindo a síntese de cortisol e de outros hormônios esteroidais. A eficácia terapêutica do trilostano é relatada em aproximadamente 70

a 75% dos casos, embora a resposta clínica apresente grande variabilidade individual (Ramsey, 2010). Protocolos posológicos incluem doses iniciais que variam entre 0,5 e 7,5 mg/kg, administradas a cada 12 horas, com ajustes que podem resultar em doses de manutenção entre 0,21 e 9,05 mg/kg de peso corporal (Lemetayer; Blois, 2018). Apesar de não corrigir a causa primária, esse fármaco tem demonstrado melhora clínica expressiva, com controle dos sinais e redução das complicações associadas.

Diante da complexidade fisiopatológica do HAC, torna-se evidente que seus efeitos extrapolam a desregulação isolada do eixo hipotálamo–hipófise–adrenal, alcançando sistemas metabólicos interdependentes, como o metabolismo lipídico, hepático, ósseo e mineral. O excesso crônico de glicocorticóides interfere em vias hormonais e enzimáticas envolvidas na absorção, no transporte, na ativação e na biodisponibilidade de micronutrientes essenciais. Nesse contexto, a vitamina D emerge como componente de particular interesse, uma vez que sua homeostase depende da adequada função intestinal, hepática, renal e endócrina, os quais frequentemente são impactados em cães com HAC. Por esta razão, compreender o metabolismo e as funções sistêmicas da vitamina D, bem como o comportamento sérico da 25(OH)D, é fundamental para interpretar seu possível papel nas alterações clínicas e bioquímicas associadas ao HAC canino.

4.2 Vitamina D

As vitaminas são micronutrientes essenciais que participam de inúmeras reações fisiológicas e garantem a homeostase orgânica. Entre elas, a vitamina D se destaca por exercer ações sistêmicas com comportamento de hormônio esteroide, modulando a expressão gênica e integrando eixos metabólicos, ósseos e imunológicos. O seu metabolismo é complexo e rigidamente regulado por enzimas e receptores específicos, assegurando o equilíbrio do cálcio e do fósforo e influenciando diversas funções biológicas (Bhagavan, 2002; Christakos *et al.*, 2016). Níveis inadequados de vitaminas, seja por ausência destas ou por falhas nas etapas de absorção, transporte e/ou ativação, podem desencadear patologias de diferentes graus de gravidade (Bhagavan, 2002).

Após a ingestão, a vitamina D é absorvida predominantemente por difusão passiva no intestino, com participação adicional de transportadores. Na circulação, seus metabólitos ligam-se majoritariamente à proteína de ligação da vitamina D (DBP), e em menor proporção à albumina, de modo que 99% das formas circulantes permanecem complexadas a proteínas carreadoras (Bikle; Schwartz, 2019). No fígado, ocorre a primeira hidroxilação pela 25-

hidroxilase, gerando 25(OH)D (calcidiol), a qual é a principal forma circulante e o melhor marcador do *status* de vitamina D. Nos túbulos proximais renais, a 25(OH)D é convertida pela 1 α -hidroxilase em 1,25-diidroxivitamina D (1,25(OH)₂D, calcitriol), forma biologicamente ativa. Alternativamente, a 25(OH)D pode ser metabolizada pela 24-hidroxilase em 24,25-diidroxivitamina D (24,25-DHCC), via que favorece a depuração e a homeostase do eixo (Christakos *et al.*, 2016; Corbee, 2020).

A síntese de calcitriol é regulada por diferentes hormônios: o hormônio da paratireóide (PTH), que estimula a 1 α -hidroxilase; o hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina-1, que participam do estímulo; e, em contrapartida, a 24-hidroxilase e o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23), que reduzem sua disponibilidade (Corbee, 2020). O calcitriol atua por meio do receptor nuclear de vitamina D (VDR), regulando a transcrição de genes envolvidos na absorção intestinal e reabsorção renal de cálcio e fósforo, na remodelação óssea, na modulação imune e na diferenciação celular (Cruz-Filho *et al.*, 2022). Esse sistema mantém o cálcio sérico em uma faixa estreita: quando o cálcio está baixo, há aumento de PTH e maior produção de calcitriol; quando o fósforo se eleva, o FGF-23 induz a 24-hidroxilase, promovendo inativação e excreção (Corbee, 2020; Cruz-Filho *et al.*, 2022). Assim, a vitamina D constitui elo central entre os sistemas esquelético, endócrino e imunológico.

A vitamina D é, portanto, essencial para o equilíbrio dos níveis de cálcio e fósforo, com o PTH desempenhando um papel central nesse processo (Kurzbard; Backus; Yu, 2021). A indução da osteoclastogênese pelo PTH visa elevar os níveis de cálcio plasmático (Cruz-Filho *et al.*, 2022), enquanto níveis reduzidos deste mineral estimulam a produção e liberação de PTH, o que, por sua vez, aumenta a excreção de fosfato e estimula a 1-alfa-hidroxilase, resultando na produção aumentada de calcitriol (Corbee, 2020). A elevação subsequente de calcitriol normaliza os níveis de cálcio sérico, além de inibir a liberação de PTH e ativar a 24-hidroxilase, que metaboliza o calcitriol em 1,24,25-tri-hidroxivitamina D para excreção urinária (Corbee, 2020). Elevadas concentrações de fósforo, por outro lado, estimulam a FGF-23, que ativa a 24-hidroxilase para a formação de 24,25-DHCC, promovendo a mineralização óssea e inibindo a 1-alfa-hidroxilase, levando à excreção de calcitriol através da maior produção de 1,24,25-tri-hidroxivitamina D (Corbee, 2020).

Em medicina veterinária, compreender as particularidades interespecíficas é fundamental. Diferentemente dos humanos, cães e gatos praticamente não sintetizam vitamina D na pele sob radiação UV, dependendo quase exclusivamente da dieta, fenômeno atribuído à

maior atividade da 7-desidrocolesterol redutase, que direciona o precursor cutâneo para colesterol, reduzindo a produção cutânea de pré-vitamina D (Kurzbard; Backus; Yu, 2021; Cruz-Filho *et al.*, 2022). Essa dependência dietética aumenta a vulnerabilidade a variações de ingestão, absorção intestinal e alterações metabólicas hepatorreais que afetam a biodisponibilidade da vitamina (Zafalon *et al.*, 2020).

Os efeitos clínicos da insuficiência/deficiência de vitamina D são amplos. Clássica no metabolismo ósseo, sua carência associa-se a raquitismo, osteomalácia e osteoporose. Estudos também relatam correlações com doenças cardiovasculares, renais, gastrointestinais, inflamatórias, autoimunes e neoplásicas (Christakos *et al.*, 2016; Corbee, 2020). O raquitismo pode decorrer de deficiência nutricional ou de distúrbios hereditários, como o VDDR-1 (deficiência de 1α -hidroxilase) e o VDDR-2 (resistência do VDR ao calcitriol), resultando em dor, marcha rígida, inchaço metafisário, fraturas e redução da mineralização óssea; há relatos de alopecia em cães e crianças com VDDR-2 (Corbee, 2020). Além disso, alterações no *status* da vitamina D podem ocorrer em pacientes com doença hepática. Como a hidroxilação do colecalciferol para formar 25(OH)D acontece no fígado, uma função hepática comprometida pode impactar o metabolismo da vitamina D, levando a concentrações séricas mais baixas de 25(OH)D (Corbee, 2020). Fármacos glicocorticóides podem reduzir a absorção de cálcio mediada pela vitamina D no intestino, diminuir a reabsorção óssea e aumentar a excreção renal de cálcio, efeitos provavelmente relacionados à regulação do PTH (Corbee, 2020).

A 25(OH)D é o biomarcador de escolha para avaliação do *status* de vitamina D por sua maior estabilidade e meia-vida (10 a 21 dias), embora seja metabolicamente inativa (Fonseca *et al.*, 2020). Em cães, têm sido propostos pontos de corte práticos: acima de 100 ng/mL como adequado, 25–100 ng/mL como insuficiência e inferior a 25 ng/mL como deficiência (Cruz-Filho *et al.*, 2022). Ainda assim, não há consenso sobre valores ideais específicos para a espécie nem padronização metodológica das dosagens, o que dificulta comparações entre estudos (Kurzbard; Backus; Yu, 2021).

Estudos populacionais indicam alta frequência de hipovitaminose mesmo em cães alimentados com dietas comerciais completas. Em amostra de 69 cães, todos apresentaram 25(OH)D inferior a 100 ng/mL, sem associação com sexo e com valores maiores em adultos *versus* filhotes; cálcio total e fósforo séricos não variaram de modo significativo segundo o *status* de vitamina D (Fonseca *et al.*, 2020). Em Golden Retrievers, 91,4% exibiram 25(OH)D₃ acima de 50 ng/mL (faixa 14–59 ng/mL), e 45% menor que 33 ng/mL, sugerindo prevalência expressiva de níveis subótimos (Kurzbard; Backus; Yu, 2021). Esses achados reforçam que

fatores além da ingestão (idade, absorção, metabolismo hepático, renal e perfil hormonal) influenciam as concentrações séricas. Em filhotes, por exemplo, níveis elevados de GH associam-se a maior conversão de 25(OH)D em 1,25(OH)₂D, reduzindo o 25(OH)D circulante (Hazewinkel; Tryfonidou, 2002; Tryfonidou *et al.*, 2003).

Na outra extremidade, a toxicidade por vitamina D cursa com hipercalcemia e calcificações de tecidos moles, manifestando-se clinicamente por poliúria, polidipsia, rigidez de marcha e letargia. Por isso, a suplementação requer monitoramento rigoroso: a administração oral de calcitriol deve começar, em geral, entre 2,0–3,5 ng/kg/dia, sem exceder 5,0 ng/kg/dia, preferencialmente em jejum e com acompanhamento seriado do cálcio (Corbee, 2020).

5. METODOLOGIA

5.1 População do estudo

Neste estudo, foram selecionados cães para participar da pesquisa, os quais foram subdivididos em dois grupos: grupo controle e grupo com HAC. Os critérios para inclusão no grupo controle foram: ausência de doenças aparentes, consumo de dieta comercial e peso de até 15 kg. Para o grupo com HAC, os critérios incluíram: diagnóstico prévio de HAC confirmado pelo teste de supressão com baixa dose de dexametasona, consumo de dieta comercial e peso de até 15 kg. Todos os cães com HAC eram hipófise-dependentes e estavam em tratamento com trilostano em fases iniciais ou de estabilização.

5.2 Tamanho amostral

A amostra deste estudo foi composta por 20 cães, distribuídos igualmente entre dois grupos: grupo controle, formado por cães clinicamente saudáveis, e grupo experimental, formado por cães com HAC, com 10 animais em cada grupo. O tamanho amostral foi estimado com base na comparação entre médias de dois grupos independentes, considerando diferença esperada entre os grupos para o desfecho contínuo avaliado, desvio padrão de 33,5, nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) e poder estatístico de 80% ($1-\beta = 0,80$). Os parâmetros utilizados foram definidos a partir de dados previamente descritos na literatura (Osuga *et al.*, 2015). O cálculo foi realizado por meio da ferramenta *online Sample Size Calculator*, disponibilizada pela plataforma ClinCalc (Kane, 2024). Com base nesses critérios, a inclusão de 10 cães por grupo foi considerada suficiente para detectar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no desfecho principal do estudo.

Os cães foram selecionados de forma não probabilística por conveniência, a partir de clínicas veterinárias parceiras, considerando a acessibilidade e disponibilidade dos participantes. Essa abordagem foi escolhida devido à viabilidade logística e à possibilidade de incluir cães que já estivessem sob cuidados veterinários, reduzindo custos e evitando procedimentos adicionais invasivos. Apesar de a amostragem ser pequena e limitar a generalização dos resultados para a população canina em geral, ela é apropriada para investigar as diferenças nos níveis de 25(OH)D entre cães normais e cães HAC, fornecendo dados preliminares que poderão fundamentar estudos futuros com maior abrangência.

5.3 Exame clínico

Os cães foram submetidos a exames clínicos por um médico veterinário para identificar variáveis como sinais de doença, raça, peso e dieta comercial.

5.4 Exames laboratoriais de rotina

Os dados clínicos dos pacientes de ambos os grupos foram obtidos por meio de prontuários e exames laboratoriais. Os parâmetros avaliados incluíram hemograma completo, creatinina, ureia, enzimas hepáticas (alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina), triglicerídeos, colesterol, glicemia, cálcio e fósforo. Todos os exames laboratoriais foram realizados em um único laboratório comercial, sendo que os pacientes de ambos grupos respeitaram o prazo de 12 horas de jejum alimentar antes da realização das coletas.

5.5 Análise dos níveis de 25(OH)D

Amostras de sangue periférico foram coletadas, centrifugadas e o soro obtido foi armazenado a -20°C para posterior análise das concentrações de 25(OH)D utilizando o método PMI-*solid phase paramagnetic microparticle immunoassay* validado para uso em cães e realizado em um mesmo laboratório comercial. Os pacientes respeitaram o prazo de 12 horas de jejum alimentar para realização das coletas.

5.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no *software* Jamovi v.2.6.44, considerando nível de significância de 5%. Inicialmente, procedeu-se à detecção de *outliers* pelo método do intervalo interquartil, com exclusão seletiva quando a remoção impactou significativamente os resultados. A normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene.

As variáveis com distribuição normal e variâncias homogêneas foram comparadas entre os grupos pelo teste t de Student; quando as variâncias foram heterogêneas, aplicou-se o teste t de Welch. Para variáveis não paramétricas, utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

A associação entre categorias de níveis séricos de 25(OH)D e a presença de HAC foi testada pelo teste do qui-quadrado de Pearson. As correlações foram exploradas por coeficiente de Spearman (para distribuições não normais) e coeficiente de Pearson (para distribuições normais).

Para explorar fatores preditores de 25(OH)D, foi conduzida regressão linear múltipla, incluindo variáveis clínicas e laboratoriais (ALT, colesterol, fosfatase alcalina, triglicerídeos, creatinina, ureia, cálcio, fósforo, glicose, hematócrito e plaquetas). Além disso, aplicou-se análise de componentes principais para investigar padrões latentes e potenciais agrupamentos entre os grupos controle e HAC.

5.7 Análise ética

A pesquisa foi conduzida após a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Caxias do Sul (UCS) (Anexo 1). Todos os responsáveis pelos cães participantes foram devidamente informados sobre os objetivos e benefícios da pesquisa, e forneceram o consentimento escrito (Anexo 2) antes da inclusão dos animais no estudo.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização da amostra

A amostra foi composta por 20 cães adultos, igualmente distribuídos entre o grupo com diagnóstico clínico de HAC ($n = 10$) e o grupo controle, formado por cães clinicamente saudáveis ($n = 10$). As principais raças identificadas foram Shih Tzu (3 em cada grupo), Pinscher (2 no grupo HAC) e sem raça definida (3 no grupo controle). As características demográficas detalhadas, como sexo, idade e peso corporal, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características demográficas dos cães incluídos nos grupos controle e HAC.

Característica	Controle	HAC	<i>p</i>
Sexo (fêmeas), n (%)	6 (60%)	5 (50%)	-
Idade (anos) ^a	9 (9–12)	12 (9–10)	0,130
Peso corporal (kg) ^b	7,97 ± 3,84	7,00 ± 3,20	0,547

Notas: N: número de indivíduos; ^aValores expressos em mediana (mínimo-máximo); ^bValores expressos em média ± desvio padrão.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à idade ($p = 0,130$) ou ao peso corporal ($p = 0,547$). A distribuição entre os sexos também foi semelhante, com leve predominância de fêmeas no grupo controle.

Todos os cães do grupo HAC apresentavam sinais clínicos compatíveis com a síndrome de Cushing, sendo a polifagia o sintoma mais prevalente (90%). Sintomas de poliúria e polidipsia persistentes foram observados em 60% dos animais. Um dos cães manifestou anorexia e perda de peso, quadro atribuído à suspeita de macroadenoma hipofisário. Ainda, foi identificado um caso de disfunção cognitiva, reforçando a diversidade fenotípica de HAC. A caracterização clínica individual desses animais está apresentada na Tabela Suplementar S1 (Apêndice A).

Além dos sinais clínicos, todos os cães com HAC apresentaram exames laboratoriais e de imagem compatíveis com o diagnóstico, incluindo aumento das adrenais à ultrassonografia abdominal e teste de supressão com baixa dose de dexametasona positivo, considerado o padrão-ouro para confirmação da síndrome.

Em relação às comorbidades clínicas, a cardiopatia foi a condição mais frequente, presente em seis cães do grupo HAC, sendo que cinco deles também apresentavam diagnóstico de hipertensão arterial. A dor articular foi referida em cinco pacientes, o que pode estar associado tanto à inflamação sistêmica quanto à idade dos animais. Além disso, dois casos de

eventos tromboembólicos foram registrados, ressaltando a necessidade de atenção para complicações vasculares associadas à síndrome.

6.2 Parâmetros laboratoriais de rotina

A análise de *outliers* foi conduzida para todas as variáveis clínicas e laboratoriais utilizando o método do intervalo interquartil (IQR), sendo considerados discrepantes os valores abaixo de $Q1 - 1,5 \text{ IQR}$ ou acima de $Q3 + 1,5 \text{ IQR}$. A maioria dos *outliers* foi mantida por apresentar plausibilidade clínica e não influenciar significativamente os resultados. No entanto, os *outliers* das variáveis creatinina e 25(OH)D foram removidos, pois sua exclusão alterou os valores de p de não significativos ($p > 0,05$) para significativos ($p < 0,05$), impactando diretamente as comparações entre os grupos. Adicionalmente, um valor discrepante identificado na variável triglicérides também foi removido. Embora a diferença entre os grupos já fosse estatisticamente significativa antes da exclusão ($p = 0,010$), observou-se que, após a remoção do *outlier*, essa diferença se manteve e apresentou maior consistência ($p = 0,004$). Essa decisão visou garantir maior robustez e fidelidade na análise estatística.

Antes das comparações entre os grupos, os pressupostos estatísticos foram avaliados. O teste de Shapiro-Wilk indicou distribuição não normal para as variáveis idade, hematócrito, ALT, fosfatase alcalina, triglicérides e 25(OH)D ($p < 0,05$), as quais foram analisadas com o teste de Mann-Whitney. As demais variáveis (peso, plaquetas, cálcio total, colesterol total, creatinina, fósforo, glicose e ureia) apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$) e foram submetidas a testes paramétricos. A homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Levene, que indicou variâncias heterogêneas para fósforo e ureia ($p < 0,05$); essas variáveis foram analisadas pelo teste t de Welch. As demais variáveis com distribuição normal e variâncias homogêneas foram analisadas pelo teste t de Student.

As Tabelas 2 e 3 resumem os parâmetros clínico-laboratoriais comparados entre os grupos, organizados conforme a distribuição dos dados. Três variáveis apresentaram diferença estatisticamente significativa: os níveis de triglicérides foram significativamente mais elevados no grupo HAC ($p = 0,004$), enquanto os níveis de creatinina ($p = 0,022$) e 25(OH) D ($p = 0,024$) foram significativamente menores nesse grupo em comparação ao grupo controle.

As demais variáveis laboratoriais (hematócrito, ALT, fosfatase alcalina, plaquetas, cálcio total, colesterol total, fósforo, glicose e ureia) não apresentaram diferenças significativas. A fosfatase alcalina mostrou tendência à significância ($p = 0,064$), sugerindo uma possível elevação no grupo HAC, embora sem confirmação estatística no presente tamanho amostral.

Tabela 2. Parâmetros clínico-laboratoriais com distribuição não normal entre cães com HAC e grupo controle.

Variável	Valores de referência	Controle	HAC	<i>p</i>
		Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	
Hematócrito (%)	38-47	47,5 (47,0-50,8)	49,0 (48,3-51,0)	0,648
ALT (UI/L)	7-80	65,0 (49,8-127,0)	144,0 (71,0-195,0)	0,190
Fosfatase alcalina (UI/L)	20-150	68,0 (53,0-57,3)	136,0 (69,3-1048,0)	0,064
Triglicérido (mg/dL)	15-150	59,0 (52,0-79,0)	137,0 (101,0-321,0)	0,004
25(OH)D (ng/mL)	100-150,9	92,0±(85,4-98,5)	61,4±(56,0-75,2)	0,024

Notas: IQR: intervalo interquartil; *p* < 0,05 em negrito.

Tabela 3. Parâmetros clínico-laboratoriais com distribuição normal entre cães com HAC e grupo controle.

Variável	Valores de referência	Controle	HAC	<i>p</i>
		Média±DP	Média±DP	
Plaquetas (10 ³ /μL)	200-500	441,0±90,8	519,0±148,0	0,173
Cálcio total (mg/dL)	8,8-11,9	9,74±0,70	9,79±0,61	0,867
Colesterol (mg/dL)	116-300	205,0±44,0	205,0±54,6	0,982
Creatinina (mg/dL)	0,5-1,4	0,92±0,25	0,67±0,17	0,022
Fósforo (mg/dL)	2,2-7,9	3,53±0,42	4,28±1,37	0,126
Glicose (mg/dL)	67-147	74,6±8,1	80,7±24,0	0,456
Ureia (mg/dL)	10-60	43,3±10,1	50,3±24,6	0,421

Notas: DP: desvio padrão; *p* < 0,05 em negrito.

6.3 Comparação dos níveis séricos de 25(OH)D entre categorias de dose de trilostano

Com o objetivo de investigar uma possível associação entre a dose de trilostano administrada e os níveis séricos de 25(OH)D, os cães com HAC foram categorizados em três grupos de acordo com a dose administrada duas vezes ao dia (em mg/kg): dose baixa ($\leq 0,5$ mg/kg), dose intermediária (0,6 – 1,1 mg/kg) e dose alta ($> 1,1$ mg/kg), conforme critérios previamente descritos na literatura especializada.

A média dos níveis séricos de 25(OH)D foi de 56,7 ng/mL no grupo de dose baixa (*n* = 3), 77,9 ng/mL no grupo de dose intermediária (*n* = 5) e 75,2 ng/mL no grupo de dose alta (*n* = 1). Apesar da aparente diferença entre as médias, não houve significância estatística entre os grupos (*p* = 0,608). Além disso, a distribuição heterogênea do número de casos por categoria, especialmente a presença de apenas um indivíduo no grupo de dose alta, comprometeu a robustez da análise e impossibilitou a aplicação de testes *post hoc*. Esses dados não permitem

concluir, com o poder estatístico atual, que existe associação entre a dose de trilostano e os níveis séricos de 25(OH)D em cães com HAC.

6.4 Comparação dos grupos quanto à concentração de 25(OH)D

A primeira análise realizada neste estudo teve como objetivo geral comparar os níveis séricos de 25(OH)D dos dois grupos avaliados em relação aos valores de referência estabelecidos para a espécie canina. Essa abordagem inicial permitiu identificar possíveis discrepâncias ou padrões consistentes nos níveis da vitamina de ambos os grupos.

Os níveis séricos de 25(OH)D foram classificados com base nos intervalos de referência fornecidos pelo laboratório comercial que realizou as análises, sendo considerados como: Deficientes: < 40 ng/mL, Insuficientes: 40 a 99,9 ng/mL, Suficientes: 100 a 150,9 ng/mL, Elevação moderada: 151 a 200 ng/mL e Hipervitaminose: > 200 ng/mL.

A maioria dos cães avaliados, tanto no grupo controle quanto no grupo HAC, apresentou concentrações compatíveis com insuficiência de vitamina D. Na análise inicial, considerando todos os valores obtidos, observou-se um caso de elevação moderada no grupo HAC e dois casos de elevação moderada no grupo controle. Adicionalmente, foi realizada análise exploratória para identificação de valores discrepantes (*outliers*), utilizando-se o critério estatístico baseado no intervalo interquartil já mencionado. Nessa avaliação, observou-se a presença de um valor considerado *outlier* no grupo HAC (162,5 ng/mL) e um *outlier* no grupo controle (167,4 ng/mL), por ultrapassarem o limite superior estabelecido para a distribuição dos dados em cada grupo. Após a remoção desses valores discrepantes, a distribuição apresentada na Tabela 4 passou a demonstrar um caso de elevação moderada no grupo controle e nenhum caso de elevação moderada no grupo HAC.

A análise estatística realizada pelo teste do qui-quadrado de Pearson após a remoção dos *outliers* não revelou associação significativa entre o *status* da vitamina D e a presença de HAC ($\chi^2(2) = 1,07$; $p = 0,587$; Tabela 4). Em análise complementar, considerando a totalidade dos dados, incluindo os valores identificados como *outliers*, também não foi observada associação significativa entre o *status* da vitamina D e o grupo avaliado ($\chi^2(2) = 0,4$; $p = 0,819$). Dessa forma, observou-se que a distribuição categórica dos níveis séricos de 25(OH)D apresentou comportamento semelhante entre os grupos avaliados, tanto antes quanto após a remoção dos valores discrepantes, indicando que esses valores extremos não alteraram substancialmente o padrão do *status* de vitamina D entre cães com HAC e controles.

Tabela 4. Distribuição dos cães segundo o *status* de vitamina D nos grupos controle e HAC.

<i>Status</i> de vitamina D	Controle	HAC	<i>p</i> valor
Suficiente	1	1	
Insuficiente	7	8	0,587
Elevação moderada	1	0	

6.5 Análises exploratórias de associação e predição

6.5.1 Correlações entre variáveis bioquímicas

Diante da diferença estatisticamente significativa observada nos níveis de triglicerídeos entre os grupos avaliados, investigou-se a possível correlação entre esse parâmetro lipídico e os níveis séricos de 25(OH)D. Considerando a distribuição não normal da 25(OH)D e dos triglicerídeos, foi adotado o teste de correlação de Spearman. A análise revelou uma correlação negativa estatisticamente significativa entre os níveis de 25(OH)D e de triglicerídeos ($\rho = -0,502$; $p = 0,04$; $n = 17$). Esse achado sugere que, na amostra estudada, níveis mais baixos de 25(OH)D associaram-se a valores mais elevados de triglicerídeos, apontando para uma possível relação inversa entre hipovitaminose D e dislipidemia em cães, tanto com HAC quanto controles.

Além disso, buscou-se avaliar a associação entre os níveis séricos de 25(OH)D e a função renal, representada pela creatinina, já que ambas as variáveis apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Para isso, foi utilizada a correlação de Spearman, que revelou uma correlação positiva, porém não significativa, entre 25(OH)D e creatinina ($r = 0,259$; $p = 0,315$; $n = 17$).

6.5.2 Modelos de regressão para predição de níveis séricos de 25(OH)D

Com o objetivo de identificar fatores associados aos níveis séricos de 25(OH)D, foi conduzida uma análise de regressão linear múltipla incluindo como variáveis independentes o grupo (controle vs. HAC) e o colesterol total. O modelo apresentou ajuste estatisticamente significativo, com coeficiente de determinação moderado ($R^2 = 0,412$), indicando que aproximadamente 41,2% da variação dos níveis de 25(OH)D pode ser explicada pela variável incluída.

Ambos os preditores foram estatisticamente significativos. O grupo apresentou associação positiva com os níveis de 25(OH)D ($\beta = 25,804$; $p = 0,043$), indicando que cães do grupo controle apresentaram níveis mais elevados de 25(OH)D em comparação aos cães com HAC. Adicionalmente, o colesterol total apresentou associação negativa com a vitamina D (β

= -0,324; $p = 0,031$), sugerindo que concentrações mais elevadas de colesterol estão associadas a níveis reduzidos de 25(OH)D na amostra avaliada.

6.5.3 Análise de Componentes Principais (PCA) e agrupamentos

Para explorar padrões latentes entre os marcadores laboratoriais e avaliar o potencial de diferenciação entre os grupos clínicos, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA). Inicialmente, diversas variáveis foram consideradas; no entanto, a seleção final foi baseada na combinação que apresentou melhor adequação estatística e coerência biológica, resultando na inclusão de vitamina D (25(OH)D), triglicerídeos e ALT. A adequação da análise foi confirmada por meio dos testes de validade, com índice KMO de 0,666 e teste de esfericidade de Bartlett significativo ($p = 0,037$), indicando estrutura de correlação suficiente entre as variáveis.

O primeiro componente principal (PC1) apresentou valor próprio superior a 1 e explicou 64,9% da variância total, representando o principal eixo de variação dos dados. As cargas fatoriais evidenciaram um padrão consistente, no qual níveis mais baixos de 25(OH)D e níveis mais elevados de triglicerídeos e ALT contribuíram para maiores escores no PC1, sugerindo a presença de um eixo metabólico associado à disfunção bioquímica observada nos animais avaliados. Entretanto, ao analisar a distribuição dos escores dos dois primeiros componentes principais (Figura 1), observou-se ampla sobreposição entre os grupos controle e HAC, sem formação de agrupamentos distintos. Esse achado indica que, embora exista um padrão bioquímico subjacente, ele não é suficiente para discriminar os grupos clínicos de forma clara, possivelmente em decorrência do tamanho amostral limitado e da heterogeneidade metabólica característica do HAC em cães.

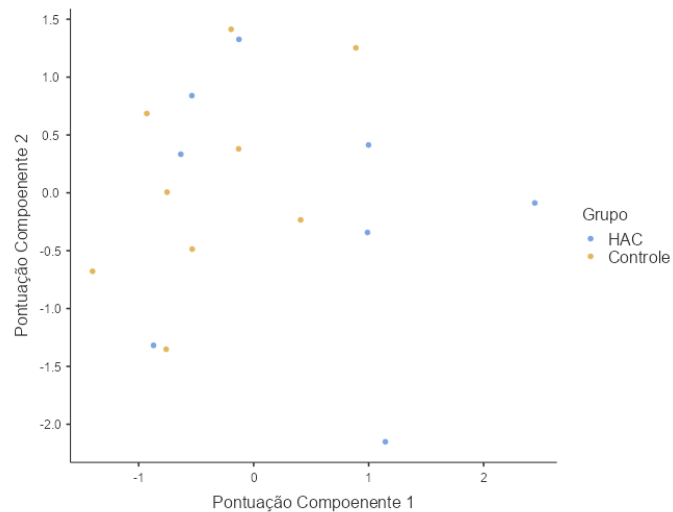


Figura 1. Gráfico de dispersão da Análise de Componentes Principais (PCA). Representação bidimensional das pontuações dos indivíduos nos dois primeiros componentes principais extraídos (Componente 1 e Componente 2), derivados das variáveis vitamina D (25(OH)D), triglicerídeos e ALT. O primeiro componente, que apresenta valor próprio superior a 1, concentra a maior parte da variância explicada dos dados, enquanto o segundo componente foi incluído exclusivamente para fins de visualização. Conforme observado no gráfico, há ampla sobreposição entre os grupos controle (amarelo) e HAC (azul), sem formação de agrupamentos distintos, indicando que o padrão bioquímico identificado não é suficiente para discriminar os grupos clínicos com base nos marcadores avaliados.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis séricos de 25(OH)D em cães com HAC em comparação a cães saudáveis, bem como explorar sua relação com parâmetros clínico-laboratoriais associados à condição. Os resultados demonstraram que cães com HAC apresentaram concentrações séricas significativamente menores de 25(OH)D em relação ao grupo controle, confirmando a hipótese principal do estudo. Esse achado é consistente com a literatura em medicina humana, na qual pacientes com síndrome de Cushing também apresentam maior frequência de hipovitaminose D (Guarnotta *et al.*, 2022). Embora o delineamento transversal deste estudo não permita estabelecer relação causal, os resultados reforçam a possibilidade de que o HAC esteja associado a alterações no metabolismo e na biodisponibilidade da vitamina D. Essa relação pode envolver a interferência dos glicocorticóides em vias relacionadas à homeostase mineral e à ativação da 25(OH)D em 1,25(OH)₂D, bem como alterações hepáticas e lipídicas capazes de afetar o transporte, a distribuição e a disponibilidade da vitamina D nos tecidos periféricos (Corbee, 2020; Bikle; Schwartz, 2019; Sieber-Ruckstuhl *et al.*, 2022).

Em relação às características demográficas, os grupos controle e HAC não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto à idade e ao peso corporal, e mostraram distribuição semelhante entre os sexos. Essa comparabilidade entre os grupos é relevante, pois reduz a possibilidade de que diferenças demográficas expliquem, de forma isolada, a menor concentração sérica de 25(OH)D observada nos cães com HAC. Esses achados dialogam com o estudo de Alizadeh *et al.* (2022), no qual sexo, estado reprodutivo e porte corporal não exerceram influência significativa sobre os níveis séricos de 25(OH)D em cães saudáveis. Embora esses autores tenham observado tendência a valores mais elevados em cães acima de cinco anos, essa diferença também não foi estatisticamente significativa. Além disso, a mediana de 25(OH)D reportada por Alizadeh *et al.* (2022), de 52,5 ng/mL, reforça que concentrações compatíveis com insuficiência podem ser frequentes mesmo em cães clinicamente saudáveis, aspecto também observado no presente estudo, especialmente quando os valores são interpretados segundo os intervalos de referência adotados.

Embora a maioria dos cães avaliados, tanto no grupo controle quanto no grupo HAC, tenha apresentado concentrações de 25(OH)D abaixo do intervalo considerado ideal, os cães com HAC exibiram valores séricos significativamente menores quando analisados como variável contínua. No entanto, a distribuição categórica do *status* de vitamina D não diferiu significativamente entre os grupos, indicando que a comparação dos valores contínuos foi mais

sensível para detectar a redução de 25(OH)D associada ao HAC. Esse achado reforça a complexidade da biodisponibilidade da vitamina D, que pode ser modulada por múltiplos fatores, incluindo absorção intestinal, metabolismo hepático e renal, transporte por proteínas carreadoras, composição corporal e interações hormonais (Fonseca *et al.*, 2020).

Do ponto de vista clínico, os sinais mais observados nos cães com HAC foram polifagia, poliúria e polidipsia, manifestações compatíveis com o quadro clínico clássico descrito para a síndrome e com as diretrizes do consenso do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) (Behrend *et al.*, 2013). A presença de um caso com anorexia e perda de peso reforça a heterogeneidade fenotípica do HAC, especialmente em apresentações menos típicas ou associadas a maior complexidade clínica. Em cães com HAC hipófise-dependente, alterações neurológicas e manifestações clínicas atípicas podem ocorrer em casos associados a macroadenomas hipofisários, nos quais os sinais variam conforme o tamanho e a taxa de crescimento da massa. Nesses contextos específicos, a radioterapia tem sido descrita como alternativa terapêutica à hipofisectomia, contribuindo para estabilização clínica e, em alguns protocolos, maior sobrevida (Rapastella *et al.*, 2023).

Entre as manifestações clínicas observadas nos cães com HAC, destacaram-se as comorbidades cardiovasculares e osteoarticulares. A hipertensão arterial, presente em cinco cães, é compatível com o perfil clínico descrito para o HAC, uma vez que o excesso crônico de glicocorticóides pode contribuir para alterações hemodinâmicas, metabólicas e vasculares. Embora o presente estudo não tenha avaliado diretamente a associação entre 25(OH)D e hipertensão arterial ou cardiopatia, a presença concomitante de menores concentrações séricas de 25(OH)D e comorbidades cardiovasculares reforça a importância de investigar esse eixo em novos estudos. Na literatura veterinária, baixos níveis de vitamina D já foram associados a pior prognóstico em cães com insuficiência cardíaca congestiva (Kraus *et al.*, 2014), maior mortalidade por doenças cardíacas (Silva; Sousa, 2020) e progressão da insuficiência cardíaca em doença valvar crônica (Osuga *et al.*, 2015). Além disso, em humanos com doença de Cushing, a suplementação com colecalciferol foi associada à melhora da sensibilidade à insulina e do perfil lipídico (Guarnotta *et al.*, 2022), sugerindo que a relação entre vitamina D, metabolismo e comorbidades cardiovasculares pode representar um campo relevante para futuras pesquisas em medicina veterinária.

No sistema musculoesquelético, a dor articular observada em cinco cães pode estar relacionada ao efeito catabólico do cortisol sobre tecidos musculares e ósseos, uma vez que o excesso de glicocorticóides pode reduzir a atividade osteoblástica e favorecer a reabsorção

óssea (Hardy; Cooper, 2010). Nesse contexto, concentrações reduzidas de 25(OH)D podem representar um fator adicional de vulnerabilidade, considerando o papel da vitamina D na homeostase mineral e na integridade musculoesquelética (Stockman; Villaverde; Corbee, 2021). Modelos experimentais em cães submetidos a glicocorticóides exógenos já demonstraram osteopenia (Quarles, 1992), o que reforça a plausibilidade de uma interação entre HAC, metabolismo ósseo e *status* de vitamina D. Entretanto, como o presente estudo não avaliou marcadores ósseos específicos, densidade mineral óssea ou associação direta entre 25(OH)D e dor articular, essa interpretação deve ser considerada exploratória.

A análise bioquímica revelou achados adicionais de relevância clínica, especialmente no que se refere ao metabolismo lipídico. Os níveis de triglicerídeos foram significativamente mais elevados no grupo HAC, em consonância com relatos prévios que descrevem alterações lipídicas em cães com essa endocrinopatia (Rosa; Melchert; Vargas, 2023). Observou-se correlação negativa entre triglicerídeos e 25(OH)D, sugerindo que menores concentrações séricas desse marcador estiveram associadas a maiores valores de triglicerídeos na amostra avaliada. Esse achado é compatível com evidências em humanos que relacionam hipovitaminose D à dislipidemia e à resistência à insulina (Huang *et al.*, 2023). Barchetta *et al.* (2011) sugerem que a vitamina D pode modular vias envolvidas no metabolismo lipídico, incluindo genes relacionados ao receptor de LDL. Dessa forma, em cães com HAC, a redução de 25(OH)D pode compor um perfil metabólico mais amplo, marcado por alterações lipídicas, sem que seja possível afirmar relação causal. Esse raciocínio é reforçado por meta-análise em humanos que demonstrou redução de triglicerídeos após suplementação de vitamina D (Dibaba, 2019), levantando a hipótese de que a correção da hipovitaminose D em cães possa ser investigada como estratégia complementar no manejo metabólico da endocrinopatia.

A diferença nos níveis séricos de 25(OH)D entre os grupos pode refletir tanto efeitos diretos do excesso de cortisol sobre o metabolismo da vitamina D quanto de alterações secundárias em sua biodisponibilidade. Alterações hepáticas, dislipidemias e redistribuição tecidual, comuns no HAC, são descritas como possíveis moduladores da concentração circulante de 25(OH)D (Sieber-Ruckstuhl *et al.*, 2022). Nesse sentido, os achados bioquímicos do presente estudo, especialmente a elevação dos triglicerídeos no grupo HAC e sua correlação negativa com 25(OH)D, sugerem que o *status* deste marcador pode estar relacionado a alterações metabólicas associadas à endocrinopatia.

De forma complementar, a regressão múltipla final indicou que o grupo clínico e o colesterol total se associaram significativamente aos níveis séricos de 25(OH)D. A associação

positiva com o grupo controle indica que cães saudáveis apresentaram concentrações mais elevadas de 25(OH)D em comparação aos cães com HAC, reforçando a diferença observada na análise entre grupos. Já a associação negativa entre colesterol total e 25(OH)D sugere que componentes do metabolismo lipídico podem participar da biodisponibilidade desse marcador, ainda que essa interpretação deva ser considerada exploratória em razão do tamanho amostral reduzido. Embora o colesterol total não tenha diferido significativamente entre os grupos, sua associação no modelo ajustado indica que esse parâmetro pode contribuir para explicar parte da variação individual dos níveis de 25(OH)D na amostra avaliada.

A PCA mostrou que 25(OH)D, triglicerídeos e ALT compuseram um eixo bioquímico comum, possivelmente refletindo interações entre metabolismo da vitamina D, metabolismo lipídico e função hepática. Nesse eixo, menores níveis de 25(OH)D e maiores valores de triglicerídeos e ALT contribuíram para maiores escores no primeiro componente principal. Embora a análise não tenha diferenciado claramente os grupos HAC e controle, possivelmente em razão do número reduzido de animais e da heterogeneidade metabólica da síndrome, o resultado sugere que a redução de 25(OH)D deve ser compreendida como parte de um fenômeno multifatorial, no qual alterações lipídicas e hepáticas podem ter papel relevante (Rijnberk; Kooistra, 2010).

Outro achado observado foi a redução significativa dos níveis de creatinina em cães com HAC. Embora a creatinina tenha diferido entre os grupos, sua correlação com 25(OH)D não foi estatisticamente significativa, o que impede inferir uma relação direta entre esse marcador e o *status* de 25(OH)D na amostra avaliada. Em cães com HAC, menores concentrações de creatinina podem refletir alterações de massa muscular associadas ao efeito catabólico crônico dos glicocorticóides, além de variações individuais relacionadas à idade, porte corporal e condição clínica. Ainda que a função renal seja importante para a conversão da 25(OH)D em 1,25(OH)₂D, os dados deste estudo não permitem atribuir a redução de 25(OH)D a alterações renais funcionais. Estudos futuros devem avaliar de forma integrada o eixo HAC, massa muscular, função renal e metabolismo da vitamina D, incluindo marcadores mais específicos de função renal e composição corporal.

Apesar de a maioria dos cães avaliados apresentarem níveis séricos de 25(OH)D abaixo do intervalo considerado ideal, nenhum animal apresentou deficiência grave, considerando o ponto de corte inferior a 25 ng/mL, nem foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de cálcio entre os grupos. Esse achado sugere que, mesmo diante de concentrações reduzidas de 25(OH)D, a homeostase mineral pode ter sido preservada por mecanismos

compensatórios. Entre esses mecanismos, destaca-se a possível participação do PTH, cuja elevação em resposta à hipovitaminose D pode contribuir para a manutenção dos níveis séricos de cálcio (Ramsey *et al.*, 2005). Em cães com HAC, já foi demonstrado que o PTH pode estar aumentado em comparação a animais saudáveis, e que o tratamento com trilostano pode reduzir o PTH e aumentar o cálcio sérico (Tebb *et al.*, 2005). Dessa forma, a avaliação integrada de 25(OH)D, PTH, cálcio e fósforo pode fornecer informações relevantes sobre alterações subclínicas do metabolismo mineral em cães com HAC, especialmente em pesquisas que incluam marcadores hormonais, minerais e de remodelação óssea de forma longitudinal (Mooney *et al.*, 2020).

Este estudo apresenta limitações metodológicas que devem ser consideradas. O tamanho reduzido da amostra, o delineamento transversal e a seleção não probabilística por conveniência limitam a generalização dos achados e impedem o estabelecimento de relações causais. Além disso, não houve controle detalhado de variáveis potencialmente associadas ao *status* de 25(OH)D, como composição da dieta, ingestão calórica, uso prévio de suplementos, tempo de diagnóstico, duração do tratamento com trilostano, estágio de estabilização clínica e condição corporal dos animais. Embora todos os cães com HAC estivessem em tratamento com trilostano, o estágio terapêutico não foi homogêneo, o que pode ter atenuado ou modulado algumas alterações metabólicas esperadas. Esses fatores reduzem o poder estatístico para análises de subgrupos e reforçam que a relação entre HAC, metabolismo lipídico, função hepática e *status* de 25(OH)D deve ser interpretada como exploratória. A biodisponibilidade da vitamina D é complexa e pode ser influenciada por fatores individuais, como genética, absorção intestinal, metabolismo hepatorenal, composição corporal e proteínas transportadoras (Weidner; Verbrugghe, 2017).

Do ponto de vista translacional, os achados deste estudo sugerem possíveis implicações práticas para o acompanhamento de cães com HAC. O monitoramento dos níveis séricos de 25(OH)D pode contribuir para a identificação de alterações subclínicas no *status* de vitamina D e auxiliar na avaliação integrada de comorbidades metabólicas, cardiovasculares e osteoarticulares frequentemente observadas nessa endocrinopatia. No entanto, considerando o delineamento transversal e o tamanho reduzido da amostra, a dosagem de 25(OH)D deve ser interpretada como ferramenta complementar, e não como marcador isolado de gravidade ou prognóstico. Da mesma forma, a suplementação da vitamina D, se conduzida com cautela e monitoramento rigoroso, pode representar uma intervenção adjuvante no manejo clínico, com potencial para reduzir complicações e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com HAC.

Futuras pesquisas, com amostras maiores, delineamentos longitudinais e maior controle de fatores de confusão, devem avaliar a evolução dos níveis de 25(OH)D em cães com HAC ao longo do tempo, especialmente em diferentes fases do tratamento com trilostano. Também será importante investigar os efeitos da suplementação de vitamina D sobre parâmetros clínicos, bioquímicos e metabólicos, incluindo perfil lipídico, marcadores hepáticos, metabolismo mineral, PTH, composição corporal, densidade óssea e indicadores de qualidade de vida. Em humanos com doença de Cushing, a suplementação com colecalciferol já demonstrou impacto positivo sobre a sensibilidade à insulina e o perfil lipídico (Guarnotta *et al.*, 2022), reforçando a relevância de investigar, de forma controlada, estratégias semelhantes em medicina veterinária.

8. CONCLUSÕES

Este estudo buscou responder se cães com HAC apresentam níveis séricos reduzidos de 25(OH)D em comparação a cães saudáveis e se esses níveis se associam a parâmetros clínico-laboratoriais relacionados à condição. Os achados demonstraram que os cães com HAC apresentaram concentrações séricas significativamente menores de 25(OH)D em relação ao grupo controle, indicando que essa endocrinopatia pode estar associada a alterações no *status* sérico desse marcador. A investigação também permitiu integrar aspectos clínicos, bioquímicos e metabólicos, contribuindo para a compreensão de uma relação ainda pouco explorada na medicina veterinária.

Quanto à caracterização da amostra, os cães com HAC apresentaram perfil clínico compatível com a síndrome, marcado principalmente por polifagia, poliúria, polidipsia, hipertensão arterial e comorbidades cardiovasculares. Também foram observadas manifestações como dor articular, anorexia em um animal e disfunção cognitiva, reforçando a heterogeneidade fenotípica do HAC e a necessidade de avaliação clínica abrangente desses pacientes.

Na análise dos níveis séricos de 25(OH)D, verificou-se que a maioria dos cães avaliados apresentou concentrações abaixo do intervalo considerado ideal, independentemente da condição clínica. Esse achado sugere que concentrações insuficientes de 25(OH)D podem ser frequentes em cães, inclusive entre animais clinicamente saudáveis, reforçando a importância de interpretar esse marcador à luz dos intervalos de referência adotados, das condições individuais dos animais e das particularidades metabólicas da espécie.

Na comparação entre os grupos, os cães com HAC apresentaram concentrações séricas significativamente menores de 25(OH)D em relação aos controles, confirmando a hipótese principal do estudo. Entretanto, a distribuição categórica do *status* de vitamina D não diferiu significativamente entre os grupos, indicando que a análise dos valores contínuos de 25(OH)D foi mais sensível para detectar diferenças entre cães com HAC e cães saudáveis. Esse resultado sugere que o HAC pode estar associado a alterações no metabolismo e/ou na biodisponibilidade da vitamina D, possivelmente por mecanismos relacionados ao excesso crônico de glicocorticóides, alterações hepáticas, metabolismo lipídico, transporte por proteínas carreadoras e redistribuição tecidual.

Quanto às análises de associação, os resultados indicaram que os níveis séricos de 25(OH)D se relacionaram principalmente a parâmetros bioquímicos associados ao metabolismo lipídico. Observou-se correlação negativa entre 25(OH)D e triglicérides, sugerindo que

menores concentrações desse marcador estiveram associadas a maiores valores de triglicerídeos na amostra avaliada. Além disso, no modelo de regressão, o grupo clínico e o colesterol total se associaram significativamente aos níveis de 25(OH)D, indicando que tanto a presença de HAC quanto componentes do metabolismo lipídico podem contribuir para a variação sérica desse marcador. Esses achados devem ser interpretados como exploratórios, mas reforçam a possibilidade de que a redução de 25(OH)D em cães com HAC esteja inserida em um contexto metabólico mais amplo.

Embora tenham sido observadas comorbidades cardiovasculares e osteoarticulares nos cães com HAC, os dados deste estudo não permitem concluir que a hipovitaminose D tenha potencializado diretamente essas manifestações clínicas. Ainda assim, a coexistência de menores níveis séricos de 25(OH)D, hipertrigliceridemia e alterações clínicas compatíveis com HAC sugere a necessidade de estudos adicionais que avaliem, de forma integrada, o papel da vitamina D no perfil metabólico, cardiovascular e musculoesquelético desses pacientes.

Os resultados obtidos indicam que o HAC em cães está associado a menores níveis séricos de 25(OH)D, em um contexto clínico e bioquímico marcado por alterações metabólicas, especialmente relacionadas ao perfil lipídico. Embora não seja possível estabelecer causalidade direta, os achados reforçam a relevância de considerar a avaliação da 25(OH)D como ferramenta complementar no acompanhamento de cães com HAC, especialmente quando associada à interpretação de parâmetros bioquímicos, condição clínica, tratamento em curso e presença de comorbidades. A suplementação de vitamina D, por sua vez, deve ser compreendida como uma possibilidade a ser investigada, e não como recomendação direta a partir dos dados deste estudo.

Entre as limitações do estudo, destacam-se o tamanho amostral reduzido, o delineamento transversal, a seleção não probabilística por conveniência e a ausência de controle detalhado sobre variáveis como composição da dieta, ingestão calórica, uso prévio de suplementos, tempo de diagnóstico, duração do tratamento com trilostano, estágio de estabilização clínica e condição corporal dos animais. Esses fatores podem ter influenciado os níveis séricos de 25(OH)D e os parâmetros bioquímicos avaliados, limitando a generalização dos achados e reduzindo o poder estatístico para análises de subgrupos. Estudos longitudinais, com maior representatividade populacional e controle de fatores de confusão, são necessários para aprofundar a compreensão da relação entre HAC, *status* de 25(OH)D e alterações metabólicas, bem como para avaliar os possíveis efeitos da suplementação de vitamina D sobre parâmetros clínicos, bioquímicos, hormonais e de qualidade de vida.

Apesar dessas limitações, o presente estudo contribui para uma lacuna ainda pouco explorada na medicina veterinária ao avaliar os níveis séricos de 25(OH)D em cães com HAC e investigar sua relação com parâmetros clínico-laboratoriais. Os achados sugerem que a redução de 25(OH)D pode integrar um perfil metabólico mais amplo associado ao HAC, especialmente envolvendo alterações lipídicas. Assim, a avaliação deste marcador pode auxiliar futuras investigações e, com maior evidência, contribuir para estratégias mais individualizadas de acompanhamento clínico em cães com essa endocrinopatia.

9. REFERÊNCIAS

- ALIZADEH, K.; AHMADI, S.; SARCAHI, A. A. *et al.* The effects of age, sex, breed, diet, reproductive status and housing condition on the amounts of 25 (OH) vitamin D in the serum of healthy dogs: reference values. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 6, p. 2360-2366, 2022.
- BARCETTA, I.; ANGELICO, F.; DEL BEN, M. *et al.* Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25 (OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. **BMC medicine**, v. 9, n. 1, p. 85, 2011.
- BEHREND, E. N.; KOOISTRA, H. S.; NELSON, R. *et al.* Diagnosis of spontaneous canine hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM consensus statement (small animal). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 27, n. 6, p. 1292-1304, 2013.
- BENNAIM, M.; SHIEL, R. E.; MOONEY, C. T. **Diagnóstico de hiperadrenocorticismo espontâneo em cães**. Parte 1: Fisiopatologia, etiologia, características clínicas e clinicopatológicas. 2019.
- BHAGAVAN, N. V. Vitamin Metabolism. In: **Medical biochemistry**. 4th ed. San Diego: Academic Press; 2002. p. 901–28.
- BIKLE, D. D.; SCHWARTZ, J. Vitamin D binding protein, total and free vitamin D levels in different physiological and pathophysiological conditions. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 317, 2019.
- CHRISTAKOS, S.; DHAWAN, P.; VERSTUYF, A *et al.* Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 365-408, 2016.
- CORBEE, R. J.; TRYFONIDOU, M. A.; MEIJ, B. P. *et al.* Vitamin D status before and after hypophysectomy in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. **Domestic animal endocrinology**, v. 42, n. 1, p. 43-49, 2012.
- CORBEE, R. J. Vitamin D in health and disease in dogs and cats. **Advances in Small Animal Care**, v. 1, p. 265-277, 2020.
- CRUZ-FILHO, J.; CASTRO, M. C. N.; MENDONÇA, A. *et al.* Utility of vitamin D serum evaluation and supplementation in dogs and cats' medical routine: a review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e40311125175-e40311125175, 2022.
- DIBABA, D. T. Effect of vitamin D supplementation on serum lipid profiles: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition reviews**, v. 77, n. 12, p. 890-902, 2019.
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W.; REUSCH, C. E. *et al.* **Canine and Feline Endocrinology**. 4th ed. St. Louis: Elsevier; 2015.
- FONSECA, F. M.; PIRES, L. V. A.; OLIVEIRA, G. K. P. *et al.* Serum concentration of 25 (OH) vitamin D in healthy dogs: factors as age, sex, and diet. **Comparative Clinical Pathology**, v. 29, n. 3, p. 697-703, 2020.

GUARNOTTA, V.; DI GAUDIO, F.; GIORDANO, C. Vitamin D deficiency in Cushing's disease: before and after its supplementation. **Nutrients**, v. 14, n. 5, p. 973, 2022.

HARDY, R.; COOPER, M. S. Adrenal gland and bone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 503, n. 1, p. 137-145, 2010.

HAZEWINKEL, H. A. W.; TRYFONIDOU, M. A. Vitamin D3 metabolism in dogs. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 197, n. 1-2, p. 23-33, 2002.

HUANG, X.; YANG, Y.; JIANG, Y. *et al.* Association between vitamin D deficiency and lipid profiles in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, v. 23, n. 1, p. 1653, 2023.

JAFFEY, J. A.; PAVLICK, M. A.; WAKSHLAG, J. J. *et al.* Diagnostic contribution of individual components of adrenal function tests to diagnose canine hyperadrenocorticism. **The Veterinary Journal**, v. 263, p. 105520, 2020.

KANE, S. P. Sample size calculator. ClinCalc: <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>. Updated June 23, 2024.

KRAUS, M. S.; RASSNICK, K. M.; WAKSHLAG, J. J. *et al.* Relation of vitamin D status to congestive heart failure and cardiovascular events in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 1, p. 109-115, 2014.

KURZBARD, R. A.; BACKUS, R. C.; YU, S. Rapid improvement in vitamin D status with dietary 25-hydroxycholecalciferol in vitamin D insufficient dogs. *Journal of Nutritional Science*, v. 10, p. e12, 2021.

LEMETAYER, J.; BLOIS, S. Update on the use of trilostane in dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 4, p. 397-403, 2018.

MOONEY, C. T.; SHIEL, R. E.; SEKIYA, M. *et al.* A preliminary study of the effect of hyperadrenocorticism on calcium and phosphate concentrations, parathyroid hormone and markers of bone turnover in dogs. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 311, 2020.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

OSUGA, T.; NAKAMURA, K.; MORITA, T. *et al.* Vitamin D status in different stages of disease severity in dogs with chronic valvular heart disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 6, p. 1518-1523, 2015.

PETERSON, M. E. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 1, p. 2-11, 2007.

QUARLES, L. D. Prednisone-induced osteopenia in beagles: variable effects mediated by differential suppression of bone formation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 263, n. 1, p. E136-E141, 1992.

RAMSEY, I. K. Trilostane in dogs. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 40, n. 2, p. 269-283, 2010.

- RAMSEY, I. K.; TEBB, A.; HARRIS, E. *et al.* Hyperparathyroidism in dogs with hyperadrenocorticism. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n. 11, p. 531-536, 2005.
- RAPASTELLA, S.; MORABITO, S.; SHARMAN, M. *et al.* Effect of pituitary-dependent hypercortisolism on the survival of dogs treated with radiotherapy for pituitary macroadenomas. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 37, n. 4, p. 1331-1340, 2023.
- RIJNBEEK, A.; KOOISTRA, H. S. **Clinical endocrinology of dogs and cats: an illustrated text.** Hannover: Schlütersche; 2010.
- RODRÍGUEZ PIÑEIRO, M. I.; CUEVA, A.; PEREZ-ALENZA, M. D. *et al.* Use of computed tomography adrenal gland measurement for differentiating ACTH dependence from ACTH independence in 64 dogs with hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 5, p. 1066-1074, 2011.
- ROSA, A. C.; MELCHERT, A.; VARGAS, A. M. Caracterização clínica e laboratorial de 131 casos (2016–2022) de hipercortisolismo ACTH-dependente canino. **Pubvet**, v. 18, n. 01, p. e1538-e1538, 2023.
- SANDERS, K.; KOOISTRA, H. S.; GALAC, S. Treating canine Cushing's syndrome: Current options and future prospects. **The Veterinary Journal**, v. 241, p. 42-51, 2018.
- SANDERS, K.; SCHOEMAN, J. P.; MEIJ, B. P. *et al.* Circulating MicroRNAs as non-invasive biomarkers for canine Cushing's syndrome. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 760487, 2021.
- SCHÄFER, I.; EBERHARDT, N.; HOPPE, S. *et al.* Diagnostic cut-off values for the urinary corticoid: creatinine ratio for the diagnosis of canine Cushing's syndrome using an automated chemiluminescent assay. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 52, n. 3, p. 443-451, 2023.
- SIEBER-RUCKSTUHL, N. S.; THAM, W. K.; BAUMGARTNER, F. *et al.* Serum lipidome signatures of dogs with different endocrinopathies associated with hyperlipidemia. **Metabolites**, v. 12, n. 4, p. 306, 2022.
- SILVA, V. B. C.; SOUSA, M. G. O papel da vitamina D nas cardiopatias de cães. **Archives of Veterinary Science**, v. 25, n. 1, p. 01-09, 2020.
- STOCKMAN, J.; VILLAVERDE, C.; CORBEE, R. J. Calcium, phosphorus, and vitamin D in dogs and cats: beyond the bones. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 51, n. 3, p. 623-634, 2021.
- TEBB, A. J.; ARTEAGA, A.; EVANS, H. *et al.* Canine hyperadrenocorticism: effects of trilostane on parathyroid hormone, calcium and phosphate concentrations. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n. 11, p. 537-542, 2005.
- TESHIMA, T.; YASUDA, N.; OHNO, K. *et al.* Effects of Carbenoxolone on the Canine Pituitary-Adrenal Axis. **Plos One**, v. 10, n. 8, p. e0135516, 2015.

TRYFONIDOU, M. A.; VAN DEN BEMD G. J.; BOSCH, C. *et al.* Dietary 135-fold cholecalciferol supplementation severely disturbs the endochondral ossification in growing dogs. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 24, n. 4, p. 265-285, 2003.

WEIDNER, N.; VERBRUGGHE, A. Current knowledge of vitamin D in dogs. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3850-3859, 2017.

ZAFALON, R. V. A.; RISOLIA, L. W.; PEDRINELLI, V. *et al.* Vitamin D metabolism in dogs and cats and its relation to diseases not associated with bone metabolism. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 1, p. 322-342, 2020.

ANEXOS

ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 CEUA-UCS

Caxias do Sul, 12 de dezembro de 2024.

Of.CEUA: 015/2024

Número: 014/2024

Título: "Avaliação dos níveis de vitamina D no hipercortisolismo canino"

Investigador Principal: Profa. Karina Guterres

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Caxias do Sul, em reunião extraordinária do dia 10 de dezembro de 2024, reavaliou o projeto supracitado, o qual foi alterado conforme orientações da CEUA, e o considerou **aprovado**, de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência da autorização	11 / 2025
Espécie / linhagem / raça	Caninos (<i>Canis lupus familiaris</i>)
No. de animais	20
Peso / Idade	até 15 kg / até 16 anos
Sexo	10 Machos e 10 Fêmeas
Origem	Clínicas Veterinárias Particulares da Serra Gaúcha

Atenciosamente,

Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn
 CEUA/UCS

CAMPUS-SEDE

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 – B. Petrópolis – CEP 95070 – 560 – Caxias do Sul – RS – Brasil
 Ou: Caixa Postal 1352 – CEP 95020 – 972 – Caxias do Sul – RS – Brasil
 Telefone / Telefax (54) 3218 2100 – www.ucs.br
 Entidade Mantenedora: Fundação Universidade de Caxias do Sul – CNPJ 88648761/0001-03 – CGCTE 029/0089530

Modelo SPN – 130033

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Avaliação dos níveis de vitamina D no hipercortisolismo canino

Nome do(a) Pesquisador(a) Responsável: Karina Weege

1. Natureza da pesquisa: O Sr(Sra.) está sendo convidado(a) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade investigar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) em cães com hipercortisolismo, visando contribuir com a saúde de cães acometidos pela endocrinopatia, buscando melhorar a qualidade de vida.

2. Identificação do(s) animal(is):

_____ (identificar espécie, sexo, raça, quantidade, nome ou número de registro, se for o caso).

3. Envolvimento na pesquisa: ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o pesquisador(a) (explicar os procedimentos que serão realizados no animal). O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa/aula, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que julgar necessário, poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do(a) pesquisador(a). Se necessário, poderá entrar em contato com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

4. Riscos e desconforto: a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Eventualmente podem ocorrer episódios de vômito ou diarreia durante a pesquisa, sendo que o imediato contato para devidas orientações poderão ser realizados. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos princípios éticos no uso de animais, elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sobre a utilização de animais em atividades educacionais e em experimentos que envolvam espécies definidas na Lei 11.794/2008.

6. Confidencialidade: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores(s) terão conhecimento dos dados.

7. Benefícios: esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a resposta à associação terapêutica apresentada, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa auxiliar outros animais com a mesma patologia futuramente, e desde já, o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.

8. Pagamento: o Sr.(Sra.) terá o benefício de redução dos custos de alguns exames que serão aplicados rotineiramente nos cães com a doença de Cushing, bem como a isenção do custo das duas consultas especializadas para monitoramento da evolução clínica do paciente.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa. Preencher, por favor, os itens que se seguem:

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Nome do
Proprietário: _____

-

CPF/RG: _____

Assinatura do Proprietário:

Assinatura do Pesquisador:

Data: ____/____/____

APÊNDICE A – Tabela Suplementar S1**Tabela Suplementar S1. Dados clínicos individuais dos cães com HAC.**

Paciente	Polifagia	Poliúria	Polidipsia	Anorexia	Disfunção cognitiva
P1	Não	Sim	Sim	Não	Sim
P2	Sim	Sim	Sim	Não	Não
P3	Sim	Sim	Sim	Não	Não
P4	Sim	Sim	Sim	Não	Não
P5	Sim	Sim	Sim	Não	Não
P6	Sim	Não	Não	Não	Não
P7	Sim	Não	Não	Não	Não
P8	Sim	Não	Não	Não	Não
P9	Sim	Sim	Sim	Não	Não
P10	Não	Sim	Sim	Sim	Não