

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E DA HIPERPLASIA  
ENDOMETRIAL CÍSTICA – PIOMETRA SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA E  
CARACTERÍSTICAS DA LIGAÇÃO HORMÔNIO-RECEPTOR EM MÚSCULO DE  
FÊMEAS CANINAS**

**ÁLAN GOMES PÖPPL**

**PORTO ALEGRE  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA  
LABORATÓRIO DE METABOLISMO E ENDOCRINOLOGIA COMPARADA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E DA HIPERPLASIA  
ENDOMETRIAL CÍSTICA – PIOMETRA SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA E  
CARACTERÍSTICAS DA LIGAÇÃO HORMÔNIO-RECEPTOR EM MÚSCULO DE  
FÊMEAS CANINAS**

**Autor:** M.V. Alan Gomes Pöpl

**Projeto de Mestrado apresentado ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fisiologia.**

**Orientador:** Profa. Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

**Co-orientador:** Prof. Dr. Luis Carlos Kucharski

**PORTO ALEGRE  
2008**

**Este trabalho é dedicado a todos os cães que, com a usual alegria e permissividade característica da espécie, participaram deste estudo.**

**Dedico este trabalho especialmente à memória de meu querido avô, Dr. Breno Martins Futuro, que infelizmente faleceu nas fases finais de correção deste trabalho não podendo prestigiar em vida a concretização deste sonho.**

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus orientadores, Profa. Dra. Roselis Silveira Matins da Silva e Prof. Dr. Luis Carlos Kucharski pela possibilidade de realização deste trabalho. Desde minha entrada no laboratório, iniciação científica e posteriormente durante minha residência, quando estive afastado do laboratório, nossas conversas sobre fisiologia e possibilidades de pesquisas sempre me incentivaram a seguir este caminho, e hoje com imensa gratidão agradeço a ambos por tudo que me proporcionaram.

A querida Profa. Dra. Ilma Simone Brum, minha “madrinha” no departamento de fisiologia, primeira professora de fisiologia e de quem posteriormente fui monitor, pelas oportunidades que me ofereceu e pelo grande incentivo para que eu me dedicasse à clínica e a pesquisa; além claro do laboratório, nitrogênio e freezer sempre a disposição; o meu muito obrigado.

Aos grandes amigos que fiz ao longo destes anos de LaMEC, pelos inúmeros momentos de descontração em meio ao trabalho, não só pelas risadas que demos juntos, e não foram poucas, mas por fazerem do nosso local de trabalho uma segunda casa, que muitas vezes serviram como motivação para vir para o laboratório nas manhãs frias de inverno, ou no trabalho até tarde nas noites de verão. Os momentos de discussão profunda sobre as técnicas, resultados e interpretação, sempre regadas a muito café, ajudaram muito a nortear os rumos deste trabalho. A todos o meu agradecimento por todos estes momentos. Ao grande amigo Ubirajara de Oliveira, sempre disposto a ajudar independente de quão atarefado estivesse e a querida colega Sandra Valle, parceira de todos os momentos durante a realização desta dissertação, desde o início até o final; os meus singelos agradecimentos por toda ajuda que me ofereceram.

Aos alunos de iniciação científica que participaram deste estudo e doaram-se em intermináveis curvas glicêmicas e cirurgias, em finais de semana, feriados ou no frio das 7 da manhã dos dias de inverno, serei eternamente grato. Sem o apoio de vocês a realização deste

trabalho não teria sido possível. Fernando, Karine, Juliana, Tatiane, Daniele, Vivian, Fabíola, Cinthia, muitos dos quais já veterinários formados, espero que tenham aprendido e aproveitado cada momento em que juntos construímos este trabalho. Aline, Gabriel, Luana, Karla, Camilas e Gabrielas que como bolsistas ou voluntárias no laboratório sempre dispostas a atender aos pedidos de ajuda, espero que nosso contato durante a realização deste trabalho tenha sido tão proveitosa à formação de vocês, como foi para mim. A todos o meu muito obrigado.

A todos funcionários, técnicos e residentes do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFRGS pela ajuda e paciência que foram fundamentais nas etapas iniciais deste trabalho. A Médica Veterinária Irene Breitsameter, obrigado pela oportunidade de atuar no saudoso projeto castração, sem sua ajuda e compreensão não teria sido viável a realização deste mestrado em tempo hábil. Ao grande amigo e profissional Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Back, pelo apoio incondicional a realização deste trabalho. Muito obrigado não só pela autorização da realização deste trabalho na instituição sobre sua responsabilidade, mas um obrigado especial pela confiança e incentivo. A Profa. Rose, obrigado por ter me ensinado a ler lâminas de citologia vaginal e pela colaboração ocasional lá no Pathos centrifugando alguma amostra para mim em finais de semana. A vocês todos não tenho palavras para expressar meus agradecimentos. Gisele e Michele, funcionárias do HCV, que sempre que eu precisava davam um jeito de arrumar uma sala cirúrgica ou material para as cirurgias do projeto, mesmo quando a autoclave estragava e a coisa mais valiosa do mundo era um avental cirúrgico esterilizado. Lucas, valeu pelas inúmeras pacientes com piometra que não raramente te pedia ajuda para preparar no pré-operatório.

Ao grande companheiro de longa data e parceiro na realização deste trabalho Prof. Dr. Félix Hilário Díaz González e toda sua equipe do LACVet pela contribuição na execução deste trabalho e viabilização de muitos aspectos deste, muito obrigado por ter aberto e ainda manter assim, as portas do laboratório! As Médicas Veterinárias Camila Serina Lasta e Vanessa Esteves muito obrigado por toda ajuda e compreensão, ainda mais quando eu aparecia com “trocentas” amostras para dosar algum metabólito, sem vocês este trabalho também não teria sido possível. Chico, valeu o dia em que salvou a realização do radioimunoensaio, pois o mestrando aqui

montou todo ensaio e esqueceu que as amostras estavam a uns 12 quilômetros do ensaio, dentro do freezer do LACVet.

Ao colega e amigo Juliano de Souza Leal, e seu orientador; o grande Prof. Dr. David Driemeier, por prontamente mostrarem-se dispostos a me auxiliar nas etapas de análise histopatológica das amostras das pacientes deste estudo, e pelos históricos churrascos para definir as metas de leitura das lâminas. Obrigado pela amizade e ajuda nesta etapa. Ao amigo Prof. Dr. João Batista pela confiança e ajuda ao me ceder seu laboratório para estoque de nitrogênio e por abrir as portas do mundo do nitrogênio líquido para mim. Sem esta singular colaboração talvez alguns pontos deste trabalho não teriam sido tão bem realizados.

A minha querida e amada Joanhinha, não só pela ajuda nesta fase final de redação, mas principalmente pela compreensão nos momentos difíceis onde tudo parece perdido, pela compreensão dos momentos de ausência e por me fazer companhia, mesmo que eu estivesse envolvido até os cabelos com a redação deste trabalho. Obrigado por todos os momentos ótimos que passamos juntos e que me renovavam e enchiam de energia para perseverar e seguir adiante.

À minha família, que já acostumou-se acreditar com minha ausência, mal humor e chatice quando estou em fases críticas, como por exemplo agora durante a redação desta dissertação. Obrigado por compreenderem que sento por último à mesa e saio correndo logo após comer, e que não participo mais dos eventos em família, ou mesmo não procuro meus parentes queridos mais próximos por estar envolvido com este prazeroso e árduo trabalho de mestrado. Obrigado por tudo mesmo. Mãe, obrigado por toda ajuda e incentivo, desde lá na primeira série até hoje em dia, quantas vezes me salvou me ditando por telefone qual era a concentração da insulina que tinha calculado no caderno, ou salvou o mundo ao buscar amostras para mim quando eu estava impossibilitado. Sem palavras para agradecer a vocês todos. Vô, sabes o quão importante foi para mim chegar até onde cheguei e ainda almejar mais, obrigado por toda ajuda intelectual, financeira e carinhosa a sua maneira!

Aos meus grandes amigos, sempre mais do que dispostos a me tirar a concentração e me levar para uma boa roda de chimarrão ou de butiquim para uma boa cerveja gelada, independente de eu estar dizendo que estava com a corda no pescoço para terminar algo. Sempre foram um grande incentivo para terminar o que estava trabalhando para poder curtir a amizade, companhia e dar risadas com vocês, que sigamos assim sempre.

*“Os pacientes nunca param de produzir água, e o fluxo é incessante como a abertura de aquedutos.”*

*“Não se consegue impedi-los de beber água ou urinar.”*

*“O diabetes é uma doença terrível, não muito freqüente entre os homens, sendo um detrimento da carne e dos membros para dentro da urina”*

**Areteu de Cappadocia, Grécia século II**

## RESUMO

O diabetes mellitus canino (DMC) é uma afecção freqüente em cães, apresentando diversos fatores etiológicos envolvidos, como raça, predisposição genética, alimentação desequilibrada, obesidade ou presença de antagonismos hormonais; como é o caso do diestro (fase luteal do ciclo reprodutivo). O DMC é mais freqüente em fêmeas, e cerca de 70% das fêmeas que desenvolvem diabetes encontram-se na fase do diestro. Muitos autores consideram o DMC, com início no diestro, análoga ao diabetes mellitus gestacional humano. Durante a fase do diestro, a progesterona induz não só resistência à insulina, mas também acarreta uma série de alterações no endométrio. Uma maior sensibilidade uterina à progesterona pode acarretar a ocorrência de hiperplasia endometrial cística (HEC) e piometra, condição séptica / inflamatória limitante à vida se não tratada. A ocorrência de qualquer anormalidade inflamatória, infecciosa, hormonal ou neoplásica apresenta um importante potencial de estimular resistência à insulina. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade à insulina durante as diferentes fases do ciclo estral e na presença da condição patológica hiperplasia endometrial cística. Ao todo 44 pacientes foram avaliadas neste estudo, sendo divididas nos grupos anestro (n = 11), estro (n = 7), diestro (n = 14), HEC (n = 5) e piometra (n = 8). Todas as pacientes passaram por avaliação física e exames laboratoriais de saúde geral. As pacientes que se enquadraram nos critérios de inclusão foram encaminhadas para realização de IVGTT (teste de tolerância à glicose intravenosa) após jejum de 8 a 12 horas (MATTHEEUWS *et al.*, 1987), após o qual foi realizada a cirurgia de castração das pacientes, de forma eletiva das pacientes na diferentes fases do ciclo estral ou como parte do tratamento nas pacientes com HEC ou piometra. Durante o procedimento operatório foram colhidas amostras de músculo para estudos de ligação hormônio receptor conforme Kucharski *et al.*, (1997) e estudos de fosforilação conforme Kucharski *et al.*, (1999). Para análise dos resultados o trabalho foi dividido em dois capítulos: o primeiro sobre o impacto do ciclo estral sobre a sensibilidade à insulina; e o segundo sobre o impacto do complexo HEC-piometra sobre a sensibilidade à insulina. A análise dos resultados mostra que a ocorrência do estro e do diestro afeta a sensibilidade tecidual à insulina reduzindo a afinidade da ligação insulina-receptor nos sítios de alta afinidade e também leva a menor capacidade de fosforilação basal dos resíduos de tirosina. Contudo, a maior capacidade de ligação destes sítios

tende a contrabalançar a menor sensibilidade tecidual a insulina não sendo possível observar estado de intolerância à glicose nestas pacientes. Entretanto, nas pacientes com HEC-piometra uma intensa resistência à insulina e intolerância à glicose pode ser observada, especialmente, em decorrência de uma severa redução na afinidade da ligação hormônio-receptor nos sítios de alta afinidade não acompanhada por um aumento na capacidade de ligação. A fosforilação dos resíduos de tirosina nas pacientes com piometra não difere da menor fosforilação basal observada nas pacientes em diestro. Na literatura consultada não foram encontrados estudos de alterações nos receptores de insulina ou nos eventos pós-receptor na etiopatogênia do DMC. Desta forma foi demonstrado pela primeira vez, alterações importantes na sensibilidade tecidual à insulina durante as fases do estro e diestro, bem como na presença de HEC-piometra, as quais podem causar uma maior predisposição à ocorrência do DMC; especialmente se as pacientes estiverem expostas a outros fatores de risco já descritos para ocorrência de diabetes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sinalização e transdução do sinal da insulina. O receptor de insulina após ativado sofre uma autofosforilação, catalizando a fosforilação de diversas proteínas celulares. Estas vias funcionam de forma coordenada na regulação do tráfego das vesículas, síntese de proteínas, ativação e inibição enzimática e expressão gênica, que resultam na regulação do metabolismo da glicose, lipídios e proteínas (SALTIEL & KAHN, 2001).....26
- Figura 2** - Regulação do metabolismo pela insulina, o mais potente hormônio anabólico conhecido. A insulina promove a síntese de carboidratos, lipídios e proteínas, inibindo sua degradação e liberação no sangue através do estímulo a captação de glicose, aminoácidos e ácidos graxos para dentro da célula (SALTIEL; KAHN, 2001).....30
- Figura 3** – Efeitos da insulina no hepatócito. A insulina estimula a expressão de genes que codificam enzimas glicolíticas e da síntese de ácidos graxos, enquanto inibe as enzimas envolvidas na gliconeogênese. Estes efeitos são mediados por diversos fatores de transcrição como SREBP-1, HNF-4, Fox e PGC-1. Além disto o hormônio também regula a atividade de algumas enzimas como a glicogênio sintase e citrato liase através da alteração no estado de fosforilação (SALTIEL; KAHN, 2001).....30
- Figura 4** – Inter-relações entre a sinalização do GH, IGF-1 e insulina (DOMINICI et al, 2005).....45
- Figura 5.** Divisão dos grupos de estudo.....68
- Figura 6.** Valores médios de leucócitos totais observados na população estudada. Não foram detectadas diferenças significativas pela análise variância de uma via ( $p > 0,05$ ).....90
- Figura 7.** Valores de fibrinogênio plasmático em cadelas em diferentes fases do ciclo estral. Não foi detectada diferença significativa na análise variância de uma via ( $p > 0,05$ ).....91
- Figura 8.** Concentração (média  $\pm$  desvio padrão da média) de fructosamina sérica nos diferentes grupos experimentais. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ).....92
- Figura 9.** Concentração (média  $\pm$  desvio padrão da média) de glicose no plasma de cadelas dos grupos anestro, estro e diestro ao longo do IVGTT.  $n = 7 - 14$  animais.....93
- Figura 10.** Concentração (média  $\pm$  desvio padrão da média) de insulina plasmática nos grupos anestro, estro e diestro ao longo do IVGTT.  $n = 3 - 7$  animais.....94
- Figura 11 a.** Medianas, intervalos interquartis e percentis 10 e 90% do aumento no índice HOMA B em relação ao basal (grupo anestro = 1). Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Kruscall-Wallis ( $p = 0,530$ )  $n = 3 - 7$  animais. **Figura 11 b.**

Medianas, intervalos interquartis e percentis 10 e 90% do índice HOMA R. Não foi detectada diferença significativa na análise variância de uma via ( $p = 0,511$ ). $n = 3 - 7$ animais.....	94
<b>Figura 12.</b> Relação (média $\pm$ desvio padrão da média) $\Delta$ Ins/ $\Delta$ GlI aos 5 minutos de IVGTT. Não foram observadas diferenças significativas pela ANOVA de uma via ( $p = 0,224$ ). $n = 3 - 7$ animais.....	95
<b>Figura 13.</b> Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do glicogênio muscular das pacientes nos referidos grupos. Não foi observada diferença significativa pela ANOVA de uma via ( $p = 0,290$ ).....	96
<b>Figura 14</b> - Inibição competitiva da ligação de $^{125}$ I-insulina em membranas de músculo esquelético, pelo aumento da concentração de insulina humana não marcada. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata.....	100
<b>Figura 15 a,b,c</b> - Curvas de Scatchard em preparações de membrana de tecido muscular esquelético de fêmeas caninas em diferentes fases do ciclo estral. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata. Curvas representativas dos grupos anestro (a), estro (b) e diestro (c).....	100
<b>Figura 16.</b> Valores médios e desvio padrão da média dos valores de fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr 4:1) em presença de albumina em preparações de membrana de tecido muscular esquelético de pacientes em anestro, estro ou em diestro. * representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação a fosforilação basal do grupo anestro.....	102
<b>Figura 17.</b> Medianas, intervalos interquartis e percentis 10 e 90% dos valores de leucócitos totais observados nos diferentes grupos. * representa diferença significativa através da análise variância de uma via, seguido do teste de Tukey ( $p = 0,004$ ). $n = 5 - 14$ .....	123
<b>Figura 18.</b> Valores (média $\pm$ desvio padrão da média) de fructosamina no plasma dos grupos diestro, HEC e piometra. * representa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os grupos diestro e piometra. ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey. $n = 5 - 14$ .....	125
<b>Figura 19.</b> Valores (média $\pm$ desvio padrão da média) de fibrinogênio plasmático dos grupos diestro, HEC e piometra. $n = 5 - 14$ .....	126
<b>Figura 20.</b> Valores médios de glicemia nos grupos diestro, HEC e piometra ao longo do IVGTT. # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre HEC e piometra. * representa diferença significativa entre HEC e piometra com relação ao grupo diestro (análise de variância para medidas repetidas com comparação de contrastes).....	128
<b>Figura 21.</b> Valores médios de insulinemia obtidos nos grupos diestro e piometra ao longo do IVGTT. * representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo piometra e o grupo diestro (análise de variância para medidas repetidas com comparação de contrastes).....	128

- Figura 22a.** Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do aumento no índice HOMA B em relação ao basal (grupo anestro = 1) dos grupos diestro e piometra. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Mann-Whitney. **Figura 22b.** Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do índice HOMA R dos grupos diestro e piometra. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste  $t$  de Student.....129
- Figura 23.** Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT dos grupos diestro e piometra. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste  $t$  de Student.....130
- Figura 24.** Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do glicogênio muscular das pacientes nos grupos diestro, HEC e piometra. Não foi observada diferença significativa pela ANOVA de uma via ( $p = 0,465$ ).  $n = 4$  a 12 animais por grupo.....135
- Figura 25** - Inibição competitiva da ligação de  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas de músculo esquelético, pelo aumento da concentração de insulina humana não marcada. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata.....137
- Figura 26 a,b** - Curvas de Scatchard em preparações de membrana de tecido muscular esquelético de fêmeas caninas durante o diestro e em fêmeas com piometra. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata. Curvas representativas dos grupos diestro (a) e piometra (b).....138
- Figura 27.** Médias e desvio padrão dos valores de fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr 4:1) em preparações de membrana de tecido muscular esquelético de pacientes em diestro ou com piometra.  $n = 6$  animais por grupo.....139

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Média, desvio padrão da média e intervalo de idade, peso e escore corporal de cadelas nas diferentes fases do ciclo estral.....89
- Tabela 2.** Média, desvio padrão e intervalo dos parâmetros hematológicos (eritrócitos, hematócrito e hemoglobina) das pacientes avaliadas dentro do grande grupo ciclo estral.....89
- Tabela 3.** Média, desvio padrão da média e intervalo dos parâmetros de lipemia avaliados (triglicerídeos e colesterol séricos) em cadelas em diferentes fases do ciclo estral. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) pela análise de variância de uma via.....91
- Tabela 4.** Médias, desvio padrão e intervalo do índice insulínogênico e da relação insulina/glicose corrigida.....96
- Tabela 5.** Razão de prevalência e intervalo de confiança 95% para alteração nos índices  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT, índice insulínogênico e relação insulina/glicose corrigida.....97
- Tabela 6.** Valores de Kd (constante de dissociação) dos sítios de ligação à insulina de alta (Kd 1) e de baixa (Kd 2) afinidade e a capacidade de ligação máxima destes sítios (Bmax 1 e Bmax 2) em músculo de cadelas em diferentes fases do ciclo estral.....101
- Tabela 7.** Média, desvio padrão e intervalo de idade, peso e escore corporal das pacientes avaliadas dentro do grande grupo hiperplasia endometrial cística - piometra.....122
- Tabela 8.** Média, desvio padrão e intervalo dos parâmetros hematológicos (eritrócitos, hematócrito e hemoglobina) das pacientes avaliadas dentro do grande grupo hiperplasia endometrial cística - piometra.....123
- Tabela 9.** Valores (média  $\pm$  desvio padrão da média e intervalo) de triglicerídeos e de colesterol séricos das pacientes em diestro (controles), com HEC e com piometra. Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na análise de variância de uma via.....124
- Tabela 10.** Médias, desvio padrão e intervalo do índice insulínogênico e da relação insulina/glicose corrigida.....131
- Tabela 11.** Resultados de  $r^2$ , r de Pearson e valores de p das variáveis de sensibilidade à insulina correlacionadas aos fatores de confusão leucograma, idade e peso.....133
- Tabela 12.** Razão de chances (*odds ratio*) e intervalos de confiança de resultados alterados nos testes de sensibilidade à insulina realizados.....134

**Tabela 13.** Média e desvio padrão dos valores de  $K_d$  (constante de dissociação) dos sítios de ligação da insulina de alta ( $K_d 1$ ) e de baixa ( $K_d 2$ ) afinidade e a capacidade de ligação máxima destes sítios ( $B_{max 1}$  e  $B_{max 2}$ ) nas pacientes em diestro ou com piometra.....138

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	por cento
±	mais ou menos
≥	maior ou igual
$\gamma^{32}\text{P}$	isótopo 32 fósforo
$\mu\text{Ci}$	microcurrie
$\mu\text{g}$	micrograma
(H)	concentração hormônio
(HR)	concentração complexo hormônio-receptor
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{mol}$	micromol
(R)	concentração receptor
$\mu\text{U}$	microunidades
<	menor
>	maior
$\Delta\text{Gli}$	delta glicose
$\Delta\text{Ins}$	delta insulina
$^{125}\text{I}$	isótopo 125 iodo
A.C.	antes de cristo
Ach	acetilcolina
ADP	adenosica di-fosfato
AG	ácido graxo
AGL	ácido graxo livre
Akt	quinase serina / treonina
ANOVA	análise de variância
APS	proteína adaptadora com domínio PH e SH
ATP	adenosina tri-fosfato
BAD	proteína proaptótica da família Bcl-2
Bmax	ligação máxima
BSA	albumina sérica bovina
$\text{Ca}^{++}$	cálcio
CAVO	complexo artério venoso ovariano
Cbl	protooncogene Cbl
CCK	colecistoquinina
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CHGM	concentração de hemoglobina globular média
cm	centímetro
$\text{CO}_2$	dióxido de carbono
COMPESQ	Comissão de Pesquisa
cpm	contagens por minuto
dL	decilitro
DM	diabetes mellitus

DMC	diabetes mellitus canino
DMG	diabetes mellitus gestacional
DMID	diabetes mellitus insulino-dependente
DMNID	diabetes mellitus não insulino-dependente
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EP	erro padrão
ER	receptor de estrógeno
et al	e colaboradores
exp	expoente
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama
Gab-1	ligador associado so Grb2 – 1
GAD	ácido glutâmico descarboxilase
GH	hormônio do crescimento
Glu	Glicina
GLUT	transportador de glicose
GPT	guanosina trifosfato
Grb	proteína ligadora do receptor de fator de crescimento
GSK	glicogênio sintase quinase
H <sup>+</sup>	hidrogênio
HbA1c	hemoglobina A1c
HCl	ácido clorídrico
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
HE	hemtoxilina-eosina
HEC	hiperplasia endometrial cística
HEC-P	hiperplasia endometrial cística – piometra
HMGB 1	proteína box de motilidade de grupo-1
HNF-4	fator nuclear hepático-4
HOMA	<i>homestatic model assessment</i>
i.e.	isto é
IC	intervalo de confiança
ICA	anticorpo anti células da ilhota
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IDD	diabetes insulino-dependente
IL	interleucina
iNO	óxido nítrico induzível
iNOS	indução óxido nítrico síntase
IR	receptor de insulina
IRD	diabetes insulino-resistente
IRS	substrato ao receptor de insulina
ITT	teste de tolerância à insulina
IVGTT	teste de tolerância à glicose intra-venosa
K <sup>+</sup>	potássio
K <sub>1</sub>	constante de afinidade

K <sub>2</sub>	constante de dissociação
K <sub>a</sub>	constante de afinidade
K <sub>d</sub>	constante de dissociação
KOH	hidróxido de potássio
KRM	Krebs ringer mamífero
LACVet	Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias
LH	hormônio luteinizante
ln	logaritmo natural
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
MAPK	proteína quinase ativadora de mitose
MG	Minas Gerais
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MIF	fator inibidor de migração
mL	mililitro
mM	milimolar
mm <sup>3</sup>	milímetros cúbicos
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
Muc-1	mucina-1
N	normal
n	tamanho da amostra
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sódio
NaCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sódio
NADH	dinucleotídeo adenina dicotinamida
NADPH	dinucleotídeo adenina dicotinamida fosfato
NF-κb	fator nuclear κb
ng	nanograma
nm	nanômetro
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
°	grau
°C	grau Celcius
OGTT	teste de tolerância à glicose oral
OR	<i>odds ratio</i>
PEPCK	fosfoenol piruvato carboxiquinase
pg	picograma
PGC-1	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1</i>
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
pH	potencial de hidrogênio
PI3K	fosfatidil inositol trifosfato
PIG	polipeptídeo inibidor gástrico
PKB	proteína quinase B
pM	picomolar
PMSF	fenilmetilsulfoxido
PR	receptor de progesterona

Proc.	processo
PTEN	gene homólogo fosfatase e tensina
RP	razão de prevalência
rpm	rotações por minuto
S.A.	sociedade anônima
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
Ser	serina
SH2	domínio homólogo a Src-2
SHP-2	domínio SH2 contendo inositol-5-fosfatase
SI	sistema imune
SOCS	proteínas supressoras da produção de citocinas
SRD	sem raça definida
SREBP-1	proteína ligadora do elemento regulatório de esteróide – 1
STAT	proteína ativadora de transcrição e transdução do sinal
TCA	ácido tricloro acético
TES	tris EDTA e sacarose
TM	<i>trade mark</i>
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
Tyr	tirosina
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VGM	volume globular médio
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
Insulina: Síntese, Secreção, Sinalização e Efeitos Metabólicos .....	24
Diabetes Mellitus Canina e o Papel da Progesterona e do GH .....	34
Ciclo Estral Canino .....	49
Complexo Hiperplasia Endometrial Cística - Piometra .....	58
Resposta Inflamatória e a Sensibilidade à Insulina .....	65
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>69</b>
Objetivos Específicos .....	69
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>71</b>
Delineamento Experimental .....	71
Animais .....	72
Protocolo Experimental .....	73
Determinações Hematológicas .....	75
Citologia Vaginal .....	75
Teste de Tolerância à Glicose Intra-Venosa (IVGTT) .....	76
Procedimento Operatório e Coleta de Tecidos .....	78
Histopatologia Uterina .....	79
Radioimunoensaio e Determinações Bioquímicas .....	80
Dosagem do Glicogênio Muscular .....	82
Preparação das Membranas do Tecido Muscular .....	82
Dosagem de Proteínas .....	83
Ensaio de Ligação da <sup>125</sup> I-Insulina em Presença de Diferentes Concentrações de Insulina Humana .....	84
Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu, Tyr 4:1) .....	86
Análise Estatística .....	87
Medidas de Associação .....	88
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>89</b>
<b>Influência do Ciclo Estral sobre a Sensibilidade à Insulina</b> .....	<b>89</b>
RESULTADOS .....	89
Animais .....	89
Determinações Hematológicas .....	90
Determinações Bioquímicas .....	91
Teste de Tolerância à Glicose Intra-Venosa (IVGTT) .....	93
Determinação do Glicogênio Muscular .....	98
Ensaio de Ligação da <sup>125</sup> I-Insulina em Presença de Diferentes Concentrações de Insulina Humana .....	99
Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu, Tyr 4:1) .....	103
DISCUSSÃO .....	104
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>122</b>
<b>Influência do Complexo Hiperplasia Endometrial Cística – Piometra</b> .....	<b>122</b>
<b>sobre a Sensibilidade à Insulina</b> .....	<b>122</b>
RESULTADOS .....	122
Animais .....	122
Determinações Hematológicas .....	123
Determinações Bioquímicas .....	124
Teste de Tolerância à Glicose Intra-Venosa (IVGTT) .....	126
Correlações de Pearson e Odds ratio .....	131
Determinação do Glicogênio Muscular .....	134
Ensaio de Ligação da <sup>125</sup> I-Insulina em Presença de Diferentes Concentrações de Insulina Humana .....	135
Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu, Tyr 4:1) .....	139
DISCUSSÃO .....	140
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>154</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	<b>157</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>170</b>

## INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica conhecida há muito tempo pela humanidade, tendo seus primeiros registros no papiro de Ebers, escrito pelo povo egípcio 1500 anos A.C., que o descreveram associado à formação de muita urina (VIEIRA, 2004). Na Grécia do século II, Areteu de Cappadócia deu o nome diabetes (do grego: *diabetes* = sifão) derivado da palavra grega *diabaino* (*dia* = através, *baino* = passar; “passar através”), caracterizando a poliúria característica da doença (VOMERO, 2002). Areteu também apresentou as primeiras definições clínicas da doença. Entre os séculos III e VI, médicos indianos descreveram nos Vedas (livros sagrados), a existência de pacientes com poliúria e urina adocicada que atraía formigas, moscas e outros insetos. Também relataram que a doença acometia dois tipos de pessoas: umas magras que não sobreviviam muito tempo e outras idosas e obesas (VIEIRA, 2004). O termo latino *mellitus* (do latim: *mellitus* = mel) só foi acrescentado durante o século XVIII por Cullen (1709-1790) afim de distinguir a doença do diabetes insipidus (VIEIRA, 2004).

O DM é conhecido em diversos animais além da espécie humana, como em carnívoros, roedores, marsupiais, eqüídeos, répteis, ruminantes dentre outros. Em cães, a descoberta da insulina teve uma grande importância nos estudos sobre diabetes (ROSENFELD, 2002). Em 1682, Bruner verificou que a retirada do pâncreas provocava poliúria e polidipsia em cães. Contudo, somente em 1869, Von Mering e Minkowski demonstraram que a pancreatemia provocava diabetes mellitus no cão. Esse achado ocorreu no mesmo ano em

que Paul Langerhans (1847-1888) descrevia pela primeira vez as ilhotas pancreáticas, porém sem sugerir qualquer função para elas (VIEIRA, 2004; CATCHPOLE *et al.*, 2005).

Durante anos, muitos pesquisadores tentaram desvendar a função das ilhotas e a relação do pâncreas com o diabetes. Nas duas primeiras décadas do século XX, diversos grupos prepararam extratos pancreáticos que obtiveram sucesso na redução da glicemia e glicosúria em cães diabéticos por pancreatectomia. No entanto, os inúmeros efeitos colaterais como sepse, febre, abscessos, intensa dor devido a presença de impurezas, reações tóxicas e proteases presentes nos extratos, inviabilizavam o uso destes extratos em pacientes humanos (ROSENFELD, 2002).

Em uma noite de insônia, o jovem cirurgião Frederick Grant Banting (1891-1941) idealizou uma forma de administrar extratos pancreáticos mais inócuos a pacientes com diabetes baseado em duas observações: (1) cães submetidos à pancreatectomia desenvolviam diabetes; e (2) cães que tinham o ducto pancreático ligado, desenvolviam degeneração acinar sem qualquer prejuízo às ilhotas, além de não apresentarem poliúria, polidipsia ou glicosúria. Assim, Banting teve a idéia de ligar o ducto pancreático de cães, esperar que ocorresse a degeneração acinar e então testar o extrato do pâncreas remanescente no controle do diabetes de cães submetidos a pancreatectomia (ROSENFELD, 2002). Em 27 de julho de 1921, Banting e seus colaboradores, Charles Best e John MacLeod, obtinham os primeiros resultados em cães diabéticos. O extrato foi batizado de insulina (do latim: *insula* = ilha) e purificado pelo bioquímico James Collip (1892-1965). Em 23 de janeiro de 1922, o extrato foi usado pela primeira vez em um paciente humano diabético; uma criança de 14 anos de idade, obtendo sucesso na redução da glicemia.

Em 25 de outubro de 1923, a equipe recebia o prêmio Nobel pela descoberta da insulina (ROSENFELD, 2002).

Atualmente o diabetes mellitus canino é uma doença endócrina bastante frequente nas rotinas clínicas, sendo uma das endocrinopatias mais comuns em cães. O estado diabético causa transtornos aos proprietários e animais devido à poliúria e polidipsia característica da doença, além da perda de visão decorrente de catarata, risco de cetoacidose diabética e predisposição às infecções (FELDMAN & NELSON, 2004). Os gastos com um paciente diabético, monitoramento e manejo terapêutico, podem facilmente ultrapassar o salário mínimo nacional; o que justifica esforços na tentativa de esclarecer cada vez mais o universo do diabetes mellitus nesta espécie.

### **Insulina: Síntese, Secreção, Sinalização e Efeitos Metabólicos**

A insulina é sintetizada nas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans como um grande pré-pró-hormônio formado após a transcrição gênica, como diversos outros hormônios protéicos. A cadeia A é composta de 21 aminoácidos enquanto a cadeia B é composta por 30 resíduos. A pré-pró-insulina com peso molecular de cerca de 11.500 daltons, apresenta um peptídeo de 23 aminoácidos que é removido logo na entrada do retículo endoplasmático das células  $\beta$  após a sua síntese a partir do mRNA mensageiro nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso. O restante da molécula é então dobrada e formam-se as pontes dissulfeto originando a pró-insulina com cerca de 9.000 daltons. O peptídeo que conecta as cadeias A e B facilita a alteração conformacional da molécula de pró-insulina e é denominado peptídeo-C. Este peptídeo está

presente em concentrações equimolares nos grânulos secretórios, uma vez que é gerado após a ação de duas proteases que geram então a insulina biologicamente ativa (5.508 daltons) separada do peptídeo-C (GANONG, 2005).

A secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas é estimulada rapidamente após aumentos na concentração plasmática de glicose. A glicose entra nas células  $\beta$  via um transportador do tipo GLUT-2. A oxidação subsequente da glicose, após a fosforilação da molécula pela enzima glicocinase, leva a um aumento rápido na concentração intra-celular de ATP; na razão ATP/ADP, e nas concentrações de NADH, NADPH e  $H^+$ . Canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP fecham-se, inibindo o efluxo de potássio da célula. Como resultado ocorre uma despolarização da célula  $\beta$ . Canais de cálcio regulados por voltagem são abertos; o que resulta num aumento rápido na concentração de  $Ca^{++}$  intra-celular responsável pela ativação do processo de exocitose dos grânulos secretórios de insulina. Estes grânulos se movem ao longo dos microtúbulos e ocorre a fusão dos grânulos com a membrana plasmática por meio da interação entre uma GTPase (proteína G monomérica) e fusinas (proteínas de membrana). A exocitose da insulina acontece na forma de hexâmeros, que rapidamente dissociam-se em dímeros e enfim monômeros biologicamente ativos (BERNE *et al.*, 2004).

Uma série de outros fatores apresentam a capacidade de estimular a secreção de insulina, como por exemplo; atividade vagal, acetilcolina (Ach), atividade  $\beta$ -adrenérgica, sulfoniluréias, meglitininas, assim como outros glicídeos, alguns aminoácidos, cetoácidos, ácidos graxos livres (AGLs),  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ , glucagon, peptídeo 1 semelhante ao glucagon, PIG – polipeptídeo inibitório gástrico, secretina e colecistoquinina (CCK). Diversos outros fatores

podem ser relacionados à inibição da secreção de insulina; como jejum, exercício, somatostatina, galanina, pancreastatina, leptina, IL-1, atividade  $\alpha$ -adrenérgica, PGE<sub>2</sub> e diazóxido (BERNE *et al.*, 2004).

Quando a insulina é secretada, circula de forma livre no sangue, apresentando uma meia vida plasmática média de 6 minutos, sendo depurada da circulação dentro de 10 a 15 minutos. As moléculas que não se ligam ao receptor de insulina nos órgãos alvo são destruídas pela enzima insulinase (proteína de membrana) no fígado, rins e músculos, assim como em todos outros tecidos, porém em menor grau. A insulina que se liga ao receptor é internalizada e destruída nos endossomos formados pelo processo de endocitose. A insulinase é internalizada junto com a insulina, sendo responsável pela lise do hormônio (GANONG, 2005).

O receptor de insulina (IR) é uma molécula heterotetramérica composta de 2 subunidades glicoprotéicas  $\alpha$ , responsáveis pela interação com a insulina, e duas subunidades glicoprotéicas trans-membrana  $\beta$ , que apresentam atividade tirosina quinase; ambas sintetizadas por um único mRNA que depois são separadas e unidas por pontes dissulfeto (GANONG, 2005; DOMINICI *et al.*, 2005). As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  atuam como enzimas alostéricas, onde a subunidade  $\alpha$  inibe a atividade tirosina quinase da subunidade  $\beta$ . Quando a insulina interage com a subunidade  $\alpha$ , causa um desbloqueio da atividade tirosina quinase da subunidade  $\beta$ , que é seguida por uma transfosforilação da mesma, com conseqüente alteração conformacional da molécula, o que aumenta ainda mais a atividade tirosina quinase (SALTIEL & KAHN, 2001).

Segundo os mesmos autores, pelo menos nove substratos intracelulares do IR já foram identificados, sendo que quatro destes pertencem à família das proteínas substrato do receptor de insulina (IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4), além dos substratos Gab-1, p60dok, Cbl, APS, isoformas de Shc assim como sinais de transdução e ativadores de transcrição - STAT (DOMINICI *et al.*, 2005). Pirola *et al.* (2004) citaram a descoberta recente do IRS-5/DOK4 e IRS6/DOK5. A fosforilação das tirosinas destes substratos agem como locais de ligação para proteínas adaptadoras que regulam suas atividades e localização subcelular. Estas proteínas apresentam domínios SH2 (Src-homogy-2), e podem ativar pequenas proteínas G. De forma simplificada; a autofosforilação do IR em resposta a ligação com o hormônio, catalisa a fosforilação de proteínas celulares membros da família IRS, GAB, Shc e Cbl. Em decorrência da fosforilação da tirosina, estas proteínas interagem com moléculas sinalizadoras por meio de seus domínios SH2, resultando em diversas séries de vias sinalizadoras (SALTIEL & KAHN, 2001; PIROLA *et al.*, 2004; DOMINICI *et al.*, 2005).

Alguns destes domínios SH2 são proteínas adaptadoras como a subunidade regulatória p85 do fosfatidilinositol-3-OH quinase (PI3K) e a proteína ligadora 2 do receptor de fator de crescimento (Grb2). Outros apresentam atividade enzimática intrínseca, como a fosfotirosina fosfatase SHP-2 e a tirosina quinase citoplasmática Fyn. Coletivamente estas moléculas orquestram as numerosas respostas fisiológicas mediadas pela insulina (DOMINICI *et al.*, 2005).

A associação entre a p85 com os IRS leva a ativação da subunidade catalítica p110. A PI3K é necessária para muitas, mas não todas as ações da insulina (DOMINICI *et al.*, 2005). A

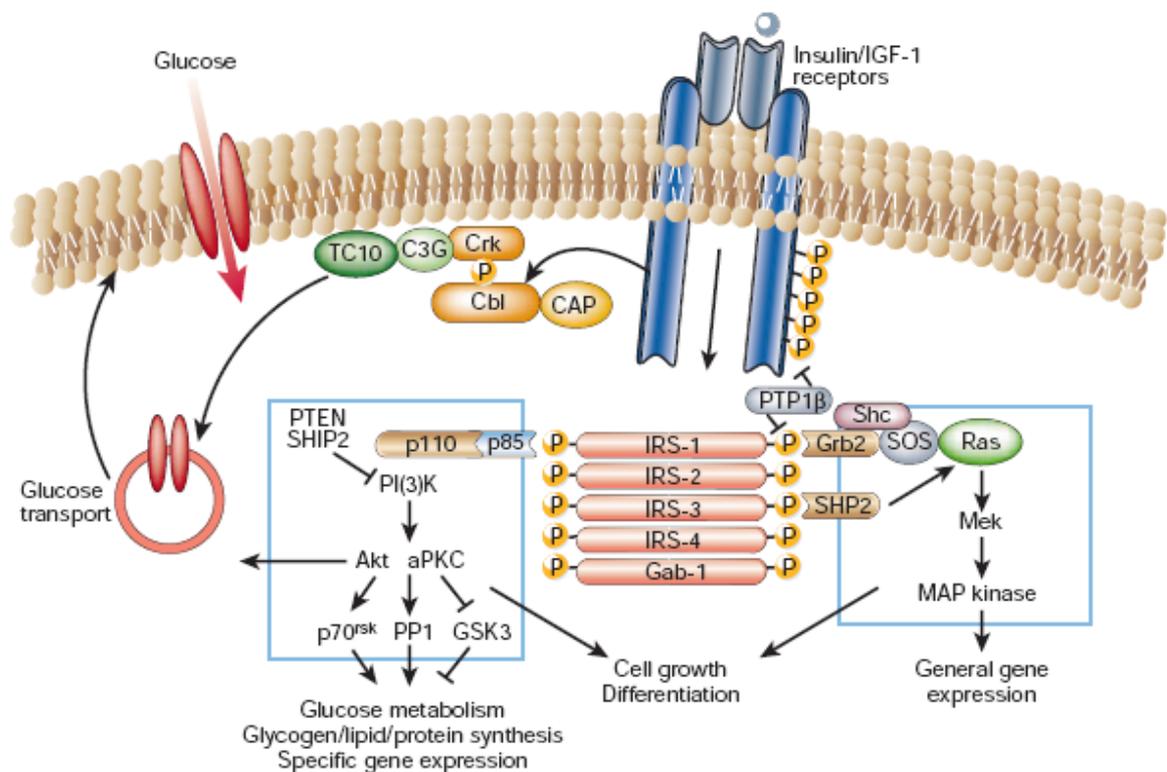
ativação da via do PI3K é responsável; por exemplo, pela translocação dos GLUT-4 para a membrana celular, síntese de glicogênio via proteína quinase B (PKB) (a qual inibe a fosforilação da glicogênio sintase quinase – GSK-3 – enzima que contra regula a glicogênio sintase), lipogênese via regulação da expressão do gene da enzima ácido graxo sintase, inibição da gliconeogênese via regulação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), assim como controle de padrões de expressão gênicas (PIROLA *et al.*, 2004; DOMINICI *et al.*, 2005).

A quinase serina/treonina (Akt), composta de duas isoformas (Akt1 e Akt2), é uma das principais efetoras da PI3K e medeia muitas das respostas da insulina, fosforilando diversos substratos, incluindo a BAD (proteína pró-apoptótica envolvida na sobrevivência celular), GSK-3 e o fator de transcrição FoxO1, que controla a expressão gênica de genes ligados a estimulação da gliconeogênese hepática, diferenciação dos adipócitos e inibição da função das células  $\beta$  (DOMINICI *et al.*, 2005).

Segundo Saltiel & Kahn (2001) a translocação das vesículas com GLUT-4 para a membrana celular não depende somente da via PI3K. Uma segunda via envolvendo o proto-oncogene Cbl é necessária para tal, e desta forma após ativação do receptor de insulina as proteínas acopladoras CAP e APS recrutam o Cbl, que é então fosforilado, resultando na ativação da proteína G Tc10 e conseqüente ativação do efector TCGAP, estimulando a translocação das vesículas. Segundo Dominici *et al.*, (2005) esta via poderia servir como um sinal alternativo à ativação da via PI3K/Akt na estimulação da captação de glicose. No entanto, a ativação da via CAP/APS/Cbl/TC10 está, de alguma forma, envolvida em mecanismos que

atenuam as ações da insulina, uma vez que camundongos *knockout* para APS e Cbl apresentam sensibilidade aumentada à insulina.

A ativação da via Ras-Raf-Mek-Erk é a terceira via principal de sinalização da insulina e resulta na ativação das proteínas quinases ativadoras de mitoses (MAPK) (DOMINICI *et al.*, 2005). A via das MAPK, apesar de apresentar um possível efeito sobre a translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática, parece estar mais envolvida com a regulação da expressão gênica e controle do crescimento e diferenciação celular; estando envolvida com os efeitos promotores do crescimento deste hormônio e parecendo ser relativamente dispensável na regulação metabólica estimulada pela insulina (SALTIEL & KAHN 2001; PIROLA *et al.*, 2004; DOMINICI *et al.*, 2005). A **figura 1** ilustra de forma sumarizada as vias de sinalização intracelulares da insulina.



**Figura 1** - Sinalização e transdução do sinal da insulina. O receptor de insulina após ativado sofre uma autofosforilação, catalizando a fosforilação de diversas proteínas celulares. Estas vias funcionam de forma coordenada na regulação do transporte das vesículas, da síntese de proteínas, da ativação e da inibição enzimática e da expressão gênica, que resultam na regulação do metabolismo da glicose, dos lipídios e das proteínas (SALTIEL & KAHN, 2001).

Em contraste à fosforilação da tirosina (Tyr), a qual serve para propagar o sinal emitido a partir do IR, a fosforilação da serina (Ser) previne que o sinal da insulina atinja seu destino final e ambos IR e IRS serão alvos desta modificação covalente. Muitas evidências indicam que fosforilação da Ser controla muitas ações do IRS-1, incluindo sua interação com o IR, assim como sua distribuição intra-celular e a sua destruição por proteassomos. Diversos indutores de resistência à insulina, como a hiperinsulinemia crônica, TNF- $\alpha$ , e aumento nos AG circulantes afetam a sinalização da insulina por este mecanismo. Um dos principais sítios de

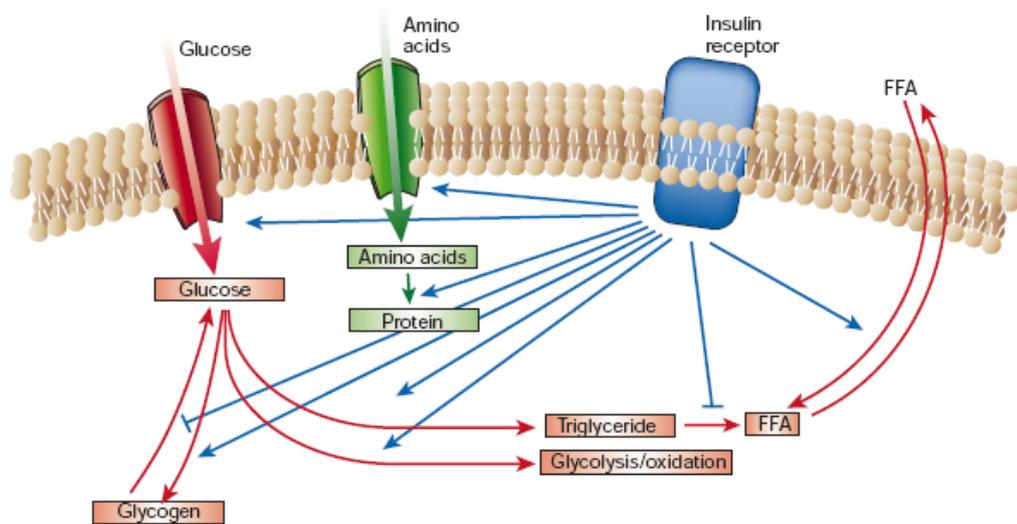
fosforilação da Ser é o resíduo Ser<sup>307</sup>. Essas fosforilações inibitórias atuam em conjunto com as fosfatases PTEN e SHP-2 e com proteínas inibitórias da família dos supressores de sinalização das citocinas (SOCS) para limitar a sinalização intra-celular induzida pela insulina (DOMINICI *et al.*, 2005).

A insulina juntamente com os fatores de crescimento (*insulin-like growth factors* - IGFs) têm um papel importante sobre o controle do metabolismo energético e do anabolismo em vertebrados mamíferos e não mamíferos. Os IGFs (IGF-I e IGF-II) e a pró-insulina dos vertebrados apresentam semelhanças na seqüência de aminoácidos e na estrutura terciária da molécula, sugerindo-se que os IGFs e a insulina possuam um gene ancestral comum (CHAN & STEINER 2000). Da mesma forma; os receptores de IGFs e o receptor de insulina pertencem a mesma sub-família de receptores com atividade tirosina-quinase (DOMINICI *et al.*, 2005). Com relação ao metabolismo energético, os efeitos da insulina ocorrem sobre o metabolismo de carboidratos, de gorduras e de proteínas. Os efeitos dos IGFs ocorrem, principalmente, sobre o crescimento, a diferenciação e a proliferação celular (CHAN & STEINER 2000). Estas moléculas são sintetizadas no fígado e em diversos outros tecidos, primariamente sob controle do GH (GRIFFIN & OJEDA, 2004). No entanto, os IGFs apresentam a capacidade de se ligar ao receptor de insulina, assim como a insulina apresenta a capacidade de se ligar aos receptores de IGFs; contudo, com menor afinidade (DOMINICI *et al.*, 2005).

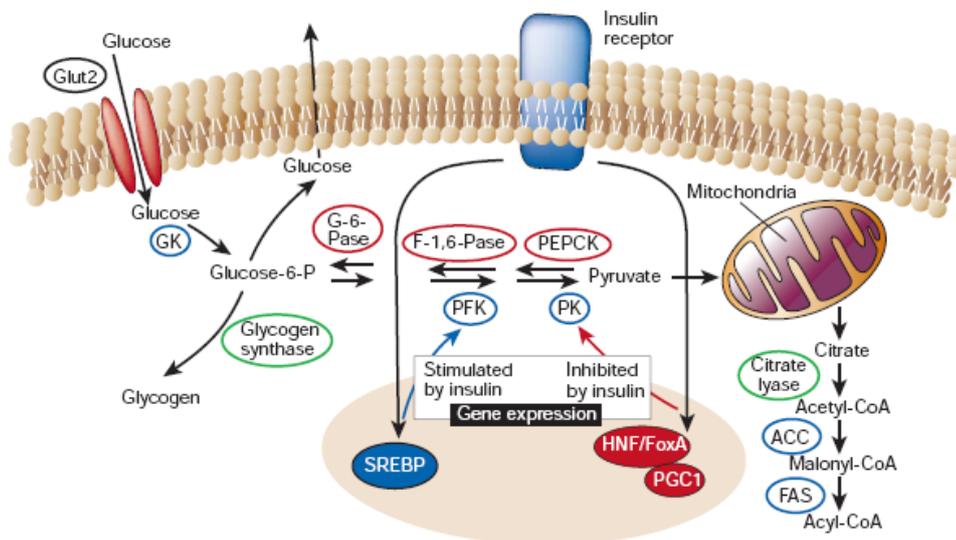
No metabolismo de carboidratos a insulina aumenta a captação de glicose no tecido adiposo e no tecido muscular, bem como aumenta a atividade glicolítica nestes tecidos. Este hormônio também estimula a síntese de glicogênio em diversos tecidos; incluindo adiposo,

muscular e hepático, e inibe a glicogenólise no fígado e no músculo. A insulina ainda inibe a gliconeogênese. Sobre o metabolismo de lipídios; observa-se inibição da lipólise no tecido adiposo (inibição da enzima lipase hormônio sensível), com conseqüente redução na concentração plasmática de ácidos graxos; estímulo à síntese de ácidos graxos e triglicerídeos nos tecidos, assim como aumento na formação de VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade) no fígado. A insulina ainda é responsável por uma maior captação de triglicerídeos do sangue para o tecido adiposo através da estimulação à enzima lipase lipoprotéica em prol da lipogênese, além de reduzir a oxidação de ácidos graxos no músculo e fígado e aumentar a síntese de colesterol hepático.

No metabolismo protéico a insulina aumenta o transporte de muitos aminoácidos para os tecidos, aumenta a síntese de proteínas no tecido adiposo, muscular, hepático dentre outros, além de reduzir a proteólise e assim a síntese de uréia (NEWSHOLME & DIMITRIADIS, 2001). A **figura 2** sumariza os efeitos anabólicos e anti-catabólicos da insulina. O fígado é alvo central da ação da insulina, onde atua através da ativação e regulação gênica de algumas enzimas chaves para armazenagem de glicose na forma de glicogênio e de lipídeos, e repressão da atividade e transcrição de enzimas envolvidas na síntese de glicose e liberação desta para circulação (SALTIEL & KAHN, 2001). Estes processos estão ilustrados na **Figura 3**.



**Figura 2** - Regulação do metabolismo pela insulina, o mais potente hormônio anabólico conhecido. A insulina promove a síntese de carboidratos, de lipídios e de proteínas, inibindo sua degradação e liberação no sangue. através do estímulo a captação de glicose, aminoácidos e ácidos graxos para dentro da célula em tecidos alvo (SALTIEL; KAHN, 2001).



**Figura 3** – Efeitos da insulina no hepatócito. A insulina estimula a expressão de genes que codificam enzimas glicolíticas e da síntese de ácidos graxos, enquanto inibe as enzimas envolvidas na gliconeogênese. Estes efeitos são mediados por diversos fatores de transcrição como SREBP-1, HNF-4, Fox e PGC-1. Além disto o hormônio também regula a atividade de algumas enzimas como a glicogênio sintase e citrato liase através da alteração no estado de fosforilação (SALTIEL; KAHN, 2001).

## **Diabetes Mellitus Canina e o Papel da Progesterona e do GH**

O diabetes mellitus canino (DMC) é uma doença crônica sistêmica decorrente de uma deficiência relativa ou absoluta de insulina. A doença é classificada basicamente de duas formas (SCHULMAN, 2003). A primeira é baseada na classificação em humanos (tipo I - juvenil e tipo II - senil) e considera mecanismos patofisiológicos e alterações patológicas das células  $\beta$  pancreáticas (HOENIG, 2002). A segunda forma de classificação, considera a necessidade pela terapia com insulina para estabelecer o controle glicêmico, prevenir a cetoacidose diabética e consequentemente permitir a sobrevivência do paciente, classificando o DM em dependente de insulina (DMID) ou DM não dependente de insulina (DMNID) (GUPTILL *et al.*, 2002).

O DM tipo I é caracterizado por uma combinação de suscetibilidade genética e destruição imunomediada das células  $\beta$ , com progressiva e muitas vezes completa deficiência de insulina (FELDMAN & NELSON, 2004). Auto-anticorpos são formados contra a insulina sérica, as células  $\beta$  e outros componentes das ilhotas pancreáticas; como a enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), estes anticorpos são utilizados na identificação de indivíduos em risco de desenvolver DM tipo I, uma vez que já estão presentes na circulação sanguínea antes do aparecimento de hiperglicemia e sinais clínicos (HOENIG, 2002). A destruição imunomediada das ilhotas pancreáticas começa pela suscetibilidade genética, e a ocorrência de um evento que irá desencadear a autoimunidade contra as células  $\beta$ .

Acredita-se que em cães o DM progrida de forma semelhante, mas infelizmente não é identificado antes dos estágios finais, quando a terapia insulínica é fundamental. Uma vez

descompensadas, e na presença de hipoinsulinemia, as células  $\beta$  não são mais capazes de recuperação (HOENIG, 2002). O DM em cães jovens é um achado extremamente raro (GRECO, 2001a), embora Souza *et al.* (2004) tenham relatado diabetes em cão Pincher de 5 meses. Estes achados motivam as discussões sobre a classificação do DM em cães.

O DM tipo II ocorre por uma resistência periférica à insulina e por disfunção das células  $\beta$  (HOENIG, 2002). Acredita-se que estes defeitos sejam de origem genética e são evidentes por até mais de uma década antes do início da doença clínica. Fatores ambientais; como a obesidade, podem acentuar o problema. Aumento nas concentrações séricas de ácidos graxos livres na circulação portal induz menor ação hepática da insulina, resultando em excesso de produção de glicose hepática e hiperglicemia pós-prandial persistente (McGARRY, 2002). A resistência muscular à insulina leva a diminuição da captação muscular de glicose após as refeições. Muitas alterações nos receptores à insulina e nas vias de sinalização pós-receptor contribuem para a resistência ao hormônio, assim como a reduzida secreção de insulina, a qual é um dos principais pontos da patogênese da intolerância à glicose no DM tipo II. Os pacientes acometidos por esta forma da doença não dependem de insulina para controlar a doença (NELSON, 2003). Este controle é obtido por meio de dieta apropriada, agentes hipoglicemiantes de uso oral e exercícios (BEHREND, 2002). A terapia com insulina pode tornar-se necessária frente a severa resistência à insulina e disfunção das células  $\beta$ . Alguns cães e gatos obesos são identificados com resistência à insulina associada à reduzida secreção do hormônio (HOENIG, 2002).

Como a classificação do DM em humanos em tipos I e II é baseada em histórico familiar, apresentação clínica (também conhecidas como diabetes juvenil e diabetes senil, respectivamente, em decorrência da idade média dos indivíduos acometidos), presença de auto-anticorpos contra células  $\beta$  e insulina, assim como testes com secretagogos de insulina (glicose, glucagon), é clinicamente relevante e talvez mais correto classificar o DM em cães como DMID e DMNID (FELDMAN & NELSON, 2004). Em cães, o histórico familiar normalmente não está disponível; a apresentação clínica não auxilia muito na diferenciação entre DM tipo I ou II; os testes de secreção de insulina não são utilizados rotineiramente e os testes imunológicos não são disponíveis nas rotinas clínicas.

Praticamente todos os cães apresentam DMID no momento do diagnóstico (NELSON, 1997). Em cães este tipo é caracterizado por hipoinsulinemia, acompanhada de ausência de aumento nas concentrações séricas de insulina e/ou peptídeo C após administração de um secretagogo como a glicose (HOENIG, 2002). O uso de dietas apropriadas e agentes hipoglicemiantes orais não é suficiente para manutenção do estado euglicêmico, o que gera dependência de insulina para manutenção da glicemia (BEHREND, 2002; SCHULMAN, 2003).

Diversos fatores estão envolvidos na etiopatogênese do DM em cães. Dentre os fatores etiopatogênicos envolvidos; a predisposição genética tem sido sugerida por associações familiares e análises de pedigree (GUPTILL *et al.*, 2002). Outros fatores potencialmente envolvidos são a insulite imunomediada, pancreatite, obesidade, antagonismos hormonais (hiperadrenocorticism, diestro, acromegalia), fármacos (glicocorticóides, estreptozotocina), infecções, doenças intercorrentes (insuficiência renal, doença cardíaca), hiperlipidemia e

amiloidose nas ilhotas; sendo este último não totalmente aceito (FELDMAN & NELSON, 2004). Segundo Fleeman; Rand (2001), a descoberta recente de que cerca de 50% dos cães diabéticos apresentam anticorpos contra células  $\beta$  suporta a existência de uma auto-imunidade humoral.

As lesões patológicas mais comuns em cães com DM são uma redução no número e no tamanho das ilhotas de Langerhans, um reduzido número de células  $\beta$  nas ilhotas e degeneração hidrópica das mesmas (HOENIG, 2002). Ausência absoluta congênita de células  $\beta$ , e aplasia ou hipoplasia de ilhotas pancreáticas já foram descritas em cães com DM (NELSON, 1997). Alterações menos severas nas células  $\beta$  e nas ilhotas podem predispor o cão adulto ao DM quando exposto aos fatores ambientais de risco (FELDMAN & NELSON, 2004). Estes fatores ambientais podem induzir a degeneração de células  $\beta$  secundariamente à resistência crônica à insulina ou podem causar liberação de proteínas celulares provenientes de células  $\beta$ . Estas proteínas podem se tornar alvos de destruição imunomediada das ilhotas de Langerhans (FELDMAN & NELSON, 2004). Infiltração linfocitária é um achado raro em cães, diferentemente do que ocorre no DM tipo I de humanos e de bovídeos. É provável que ocorram infiltrados leucocitários nas ilhotas pancreáticas no início do processo auto-imune, porém já haveriam desaparecido no momento da morte na maioria dos cães diabéticos (HOENIG, 2002). Segundo o mesmo autor, após episódios de pancreatite, 30% dos casos apresentam destruição de ilhotas, que são substituídas por tecido fibroso. Em outros casos ocorre degeneração de ilhotas ou nenhuma ilhota é encontrada.

Intolerância aos carboidratos, induzida por obesidade, e a presença de amilóide em ilhotas, já foram encontrados em alguns cães diabéticos. Embora o reconhecimento clínico de DMNID seja bastante raro em cães (MATTHEEUWS *et al.*, 1984; HOENIG, 2002). Sowa *et al.* (1990) demonstraram que o polipeptídeo amilóide pancreático causa resistência periférica à insulina *in vivo*. A proteína amilóide presente nas ilhotas é considerada uma importante característica do DM tipo II em humanos (HOENIG, 2002). Uma pequena porcentagem de cães diabéticos apresenta aumento dos níveis de peptídeo C em testes de liberação de insulina, o que sugere a presença de algumas células beta funcionais (FELDMAN & NELSON, 2004). Infelizmente estes cães necessitam de terapia com insulina para diminuir a hiperglicemia (SCHULMAN, 2003).

Catchpole *et al.*, (2005) classificaram o DM canino como diabetes insulino-deficiente (IDD) e diabetes insulino-resistente (IRD). A IDD primária em cães seria caracterizada por uma perda progressiva de células  $\beta$  pancreáticas; causada por doenças como hipoplasia/abiotrofia congênita de células  $\beta$ , perda de células  $\beta$  secundária a doença pancreática exócrina, destruição imuno-mediada de células  $\beta$  ou idiopática. A IRD primária resultaria de antagonismos à função da insulina por outros hormônios (diestro/diabetes gestacional); secundária a outras doenças endócrinas (hiperadrenocorticismo e acromegalia); iatrogênica (uso de glicocorticóides e progestinas sintéticas) e ainda por intolerância a glicose associada à obesidade, porém não como causa primária do DM em cães. A IRD pode ocasionar um estado diabético reversível; extremamente incomum em cães, sendo considerado por alguns autores como DM tipo III (KANEKO *et al.*, 1997). Nestes casos, o reconhecimento precoce da resistência à insulina e

conseqüente tratamento adequado da endocrinopatia concomitante, pode resolver o DM tipo III retornando a um estado euglicêmico sem o uso contínuo de insulina (BEHREND, 2002).

Apesar de haver adequada massa de células  $\beta$  funcionais, estas não conseguem secretar insulina suficiente para a manutenção da euglicemia na presença de um antagonismo patológico aos efeitos da insulina (BEHREND, 2002). Falhas em corrigir rapidamente estes antagonismos resultam em perda de células  $\beta$  e eventual desenvolvimento de DMID secundário (FELDMAN & NELSON, 2004). Fleeman & Rand (2001) relataram que uma hiperglicemia crônica ( $>250$  mg/dL) por cerca de duas semanas é suficiente para causar perda de células  $\beta$  e DM permanente devido a resistência periférica à insulina e supressão da secreção deste hormônio (glicotoxicidade). A hiperglicemia persistente após pancreatite é outra forma de DM secundário. A ativação de enzimas pancreáticas dentro dos acinos e sistema de ductos pancreáticos inicia a pancreatite, e o envolvimento das ilhotas pode ocorrer por extensão da necrose e inflamação pelos tecidos ao redor (FLEEMAN & RAND, 2001). Além disto, a auto-imunidade contra células  $\beta$ , inflamação pancreática e a regulação da imunidade intestinal podem estar interligadas na patogênese do processo, uma vez que pessoas com DM tipo I normalmente apresentam regulação da imunidade intestinal anômala. Dois fatores de risco que estão freqüentemente implicados na patogênese do DM tipo I são infecções enterovirais e exposição às proteínas do leite de vaca (RAND *et al.*, 2004).

A grande maioria dos cães recentemente diagnosticados com DM apresentam concentrações de insulina menores que  $12 \mu\text{U/mL}$  ou muitas vezes indetectáveis. Concentrações maiores que  $18 \mu\text{U/mL}$  sugerem a existência de células  $\beta$  funcionais e a possibilidade de DM

secundário com possibilidade de reversão do quadro a um estado não dependente de insulina se os antagonismos hormonais presentes forem eliminados. Ainda assim, a terapia com insulina é recomendada nestas situações para correção da hiperglicemia e redução do estresse às células beta enquanto o antagonismo não é resolvido (FELDMAN & NELSON, 2004).

Ainda que a obesidade cause resistência à insulina em cães, não existem trabalhos bem documentados que convincentemente demonstrem que o DM tipo II exista como uma doença significativa em cães (RAND *et al.*, 2004). Nenhum trabalho epidemiológico foi publicado avaliando a relação entre obesidade e DM em cães desde 1960. Contudo, Krook *et al.* (1960) observaram que a prevalência de DM era maior em cães obesos. A obesidade é um fator de risco bem estabelecido para DM tipo II em gatos e em humanos. Porém, em cães não há nenhum relato de uma forma de diabetes semelhante ao tipo II. Nesta espécie a obesidade causa resistência à insulina, que leva a hiperinsulinemia e a intolerância à glicose (MATTHEEUWS *et al.*, 1984). Entretanto, o estudo de Mattheeuws *et al.* (1984) utilizou 15 cadelas obesas com DM e secreção residual de insulina. No entanto; das 15 pacientes, 13 eram fêmeas intactas, o que torna difícil separar os efeitos da resistência à insulina induzida pelo diestro e da resistência à insulina induzida pela obesidade (RAND *et al.*, 2004).

A obesidade induzida por dieta rica em gorduras saturadas provoca efeitos pronunciados. Cães alimentados com uma dieta rica em gordura desenvolvem resistência insulínica não compensada por aumento na secreção hormonal, resultando em intolerância à glicose mais severa; além de sofrerem uma redução no transporte de insulina para o SNC (KAYALA *et al.*, 1999; KAYALA *et al.*, 2000; RAND *et al.*, 2004). Um estudo epidemiológico

conduzido na região de Porto Alegre - Brasil evidenciou que 69% dos proprietários de cães diabéticos consideravam seus cães com sobrepeso ou obesos antes do diagnóstico (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005). O mesmo estudo documentou que 50% dos pacientes com diabetes recebiam a cada refeição, comida caseira mais ração e que outros 29% deles recebiam somente comida caseira como dieta até o momento do diagnóstico. Nesta população de pacientes diabéticos estudada; 79% deles recebiam petiscos como pães, biscoitos, doces e chocolates fora dos horários das refeições; o que corrobora com a hipótese de obesidade e de desequilíbrio nutricional como fatores de risco para o desenvolvimento da DM canina (MATTHEEUWS *et al.*, 1984; KAYALA *et al.*, 1999; PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005).

Em um estudo de caso-controle conduzido na Suécia; Klinkenberg *et al.* (2006) observaram também uma maior ocorrência de obesidade e de alimentação desequilibrada (comida caseira sozinha ou associada à ração e petiscos) nos pacientes diabéticos quando comparados aos controles. Além disto, evidências em outros modelos biológicos apontam para os efeitos deletérios da obesidade sobre a sensibilidade à insulina e predisposição ao DM. Além das diversas adipocitocinas liberadas pelos adipócitos, os AGLs reduzem a captação de glicose muscular e a secreção de insulina e aumentam a produção hepática de glicose (McGARRY, 2002). Os AGL também estão associados à reduzida fosforilação de mensageiros intra-celulares, resultando em menor resposta à insulina (SALTIEL & KAHN, 2001). A redução na secreção de adiponectina na obesidade (adipocitocina com efeitos pró-insulina) é outro fator importante na interação obesidade – homeostase da glicose (COSTA & DUARTE, 2006).

O pico de prevalência do DM em cães é entre os 7 e 9 anos (GRECO, 2001a), com uma incidência de 1:100 a 1:500 (NELSON, 1997). Guptill *et al.* (2002) citam uma prevalência de 1:270 nos EUA, enquanto Pöpl & González (2005) observaram uma prevalência de 1:865 (0,11%) na região de Porto Alegre - Brasil. Segundo Catchpole *et al.*, (2005) a prevalência de diabetes esta estimada em algo entre 0,0005% e 1,5% (0,32% no Reino Unido). Esta incidência esta aumentando significativamente nas últimas décadas (GUPTILL *et al.*, 2002). Entre 1970 e 1999 a prevalência hospitalar de DM cresceu de 19 casos para cada 10.000 cães para 64 casos para cada 10.000 cães nos Estados Unidos. Este aumento na prevalência deve-se não só a avanços nas técnicas e no conhecimento dos veterinários (hipótese suportada pela redução na mortalidade destes pacientes de 37% para 5% no mesmo período), mas também devido a maior prevalência de obesidade, de alimentação desequilibrada, de estresse e de sedentarismo nos animais (GUPTILL *et al.*, 2002; NEUVIANS & BERGER, 2002; RAND *et al.*, 2004; CATCHPOLE *et al.*, 2005; KLINKENBERG *et al.*, 2006).

Apesar de em humanos não estar totalmente elucidado o componente genético do DMID, sabe-se que estão envolvidos genes do MHC (complexo de histocompatibilidade principal), responsáveis pela resposta imune. Em cães não foi encontrada correlação com estes genes. Outros genes menos importantes envolvidos na patogênese do DM em humanos variam amplamente entre diferentes etnias, nacionalidades e localizações geográficas. Possivelmente, diversas raças puras de cães tenham diferentes genes envolvidos na patogênese do DM (HESS *et al.*, 2000).

Predisposição genética para o desenvolvimento da doença, via associações familiares e estudos de pedigree, foram descritos em cães Keeshounds (Wolf Spitz, cão lobo), raça pouco popularizada no Brasil e em Poodles miniatura, Samoiedas e Rottweillers (RAND *et al.*, 2004). Diversos estudos identificaram raças de cães com maior ou menor risco de desenvolver DM (HESS *et al.*, 2000; GUPTILL *et al.*, 2002). Australian Terrier, Schnauzer, Samoieda, Pug, Fox Terrier, Keeshound, Bichon Frise, Spitz, Husky Siberiano, Poodles toy e miniatura aparecem em diferentes estudos como raças com maior chance de desenvolver DM comparados a cães sem raça definida (HESS *et al.*, 2000; GUPTILL *et al.*, 2002). Nenhum fator genético responsável pelo início da doença foi descoberto nessas raças e as alterações histopatológicas diferem em cães que desenvolvem DM na infância (aplasia e hipoplasia de ilhotas) com relação àqueles que desenvolvem DM na idade adulta (infiltrados inflamatórios e destruição de ilhotas) (GUPTILL *et al.*, 2002). Raças como o Pastor Alemão, Golden Retriever, American Pitbull, Terrier, Boxer, Collie, Pequinês, e Pointer são raças com menor risco de desenvolver DM (HESS *et al.*, 2000; GUPTILL *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que a popularidade das raças em diferentes regiões pode alterar estes dados com relação à predisposição à doença (FELDMAN & NELSON, 2004). Guptill *et al.*, (2002) não encontraram correlação entre a variação sazonal na incidência de DM. Contudo, outros autores verificaram em cães uma maior incidência de DM entre os meses de novembro e janeiro no hemisfério norte (RAND *et al.*, 2004; CATCHPOLE *et al.*, 2005)

Suspeita-se que raças nórdicas como Husky, Samoyeda, Spitz e Keeshound apresentem um mecanismo metabólico semelhante ao observado em *Psammomys obesus* (gérbil, modelo de

pesquisa para estudos da Síndrome Metabólica Humana) e certas populações humanas que apresentam alto risco de desenvolver DM tipo II, pois os ancestrais destas raças teriam sido criados para sobreviver a longos períodos de pouca disponibilidade de alimentos (GUPTILL *et al.*, 2002).

Em fêmeas, a incidência de DM é duas vezes maior que em machos (FLEEMAN & RAND, 2001), cerca de 70% dos pacientes diagnosticados com diabetes são fêmeas (CATCHPOLE *et al.*, 2005). Estudo em nossa região encontrou 95% de fêmeas diabéticas entre 20 pacientes diagnosticados com DM no período entre 2000 e 2004 (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005). Machos castrados apresentam maior chance de desenvolver DM que machos inteiros, assim como cães com menos de 22 kg de peso têm mais chances que cães mais pesados (GUPTILL *et al.*, 2002). Segundo Greco (2001a,b) o DM em filhotes é extremamente raro, sendo incomum o aparecimento da doença em cães com menos de um ano.

O DM em fêmeas intactas é freqüentemente associada com a fase do ciclo estral onde predomina a progesterona (diestro), e assemelha-se ao diabetes gestacional (DMG) em humanos (CATCHPOLE *et al.*, 2005). Pöppel & González (2005) evidenciaram uma prevalência de 69% de DM durante a fase de diestro. No Reino Unido, a redução no uso de progestágenos sintéticos e a prática de esterilização das fêmeas não reprodutoras vem reduzindo a DM decorrente do diestro em fêmeas caninas.

Em humanos, o diabetes mellitus gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com começo ou primeira constatação durante a gestação (RAND *et al.*,

2004). Durante uma gestação normal humana, há um aumento progressivo na secreção de insulina em resposta à sobrecarga de glicose ou outros estímulos, observando-se uma menor sensibilidade à insulina nos dois terços finais de gestação. As mulheres que desenvolvem DMG manifestam vários graus de hiperglicemia e hiperlipidemia além de maior chance de complicações no parto e morbidades para mãe e neonato. Etnia, obesidade, distribuição de gordura corporal, idade, dieta e exercícios são os principais fatores não-gestacionais que influenciam a sensibilidade à insulina (COUSINS, 1991; BEISCHER *et al.*, 1991). Entretanto, o principal fator envolvido no desenvolvimento do DMG seria as flutuações hormonais durante a gestação (COUSINS, 1991). Ryan & Enns (1988) observaram em adipócitos de ratos, que durante a gestação a ligação da insulina ao IR foi normal, porém o transporte de glicose foi reduzido. A ligação máxima da insulina ao receptor foi observada com o aumento do estradiol. A progesterona e o cortisol reduziram a ligação máxima da insulina ao receptor e o transporte de glicose. A prolactina e o lactogênio placentário humano reduziram o transporte de glicose, porém não alteraram a ligação da insulina ao seu receptor; fatores consistentes com defeitos de sinalização da insulina durante a gestação (RYAN & ENNS, 1988).

Na espécie canina, a progesterona, assim como os progestágenos sintéticos, podem aumentar a liberação de hormônio do crescimento (GH) pelo tecido mamário, sendo um importante fator envolvido na resistência à insulina e também associado a tumores de mama e ao complexo hiperplasia endometrial cística - piometra (FERREIRA & LOPES, 2000; RIJNBERK *et al.*, 2003). Normalmente ocorre uma redução na sensibilidade à insulina em cadelas prenhes sadias entre os dias 30 e 35 da gestação, tornando-se mais grave no final da gestação. O diestro na cadela dura aproximadamente o mesmo tempo de uma gestação (9 semanas) e considera-se o

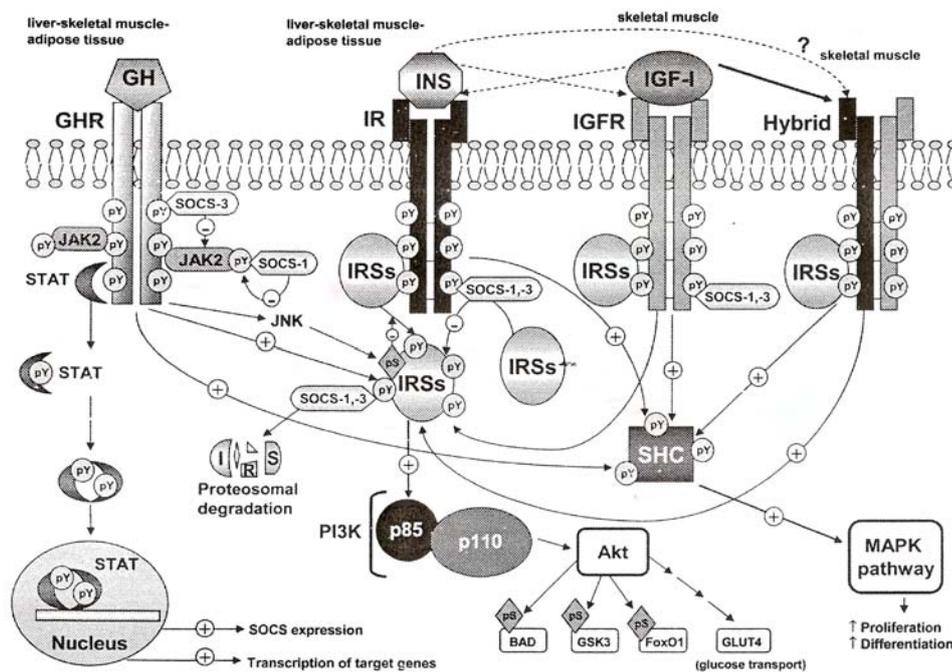
perfil hormonal do diestro e das prenhes praticamente idênticos (FLEEMAN & RAND 2001). Cadelas com DM transitório, causado por diestro, apresentam grandes chances de desenvolver DMID na próxima fase progesterônica do ciclo estral. Por este motivo é recomendada a castração logo após o diagnóstico de DM (FLEEMAN & RAND, 2000). Cerca de 5% das pacientes com diagnóstico inicial de DM durante o diestro podem reverter a um estado euglicêmico se submetidas a castração (FELDAM & NELSON; 2004). Se o DM persistir após o fim do diestro, deve-se reclassificá-lo como DMID (RAND *et al.*, 2004).

O aumento na concentração sérica de progesterona durante o diestro pode causar diabetes em cães, por promover um efeito antagônico à insulina, reduzindo a ligação de insulina ao receptor e o transporte de glicose nos tecidos alvos (RYAN & ENNS, 1988; RAND *et al.*, 2004) e secundariamente por promover a liberação de GH pela glândula mamária (SELMAN *et al.*, 1994, RIJNBERK *et al.*, 2003). O GH, um dos contra-reguladores da insulina, reduz a concentração de receptores à insulina, reduzindo a captação de glicose nas células alvo (MOLLER & FLIER, 1991). Contudo, Dominici *et al.* (2005) consideram a redução na concentração do IR na membrana celular das células alvo, como consequência da *down-regulation* decorrente da hiperinsulinemia devido à resistência insulínica gerada pelo GH. Os efeitos lipolíticos do GH também são antagônicos aos efeitos da insulina (GANONG, 2005).

O reconhecimento da contra-regulação do GH sobre os efeitos da insulina data de quase sete décadas, no entanto somente há pouco tempo os mecanismos moleculares envolvidos na resistência insulínica promovida pelo GH tornaram-se conhecidos. Evidências acumuladas sugerem que o GH modula a sensibilidade à insulina por múltiplos mecanismos, pois as vias de

sinalização intra-celular do GH e de seu principal efector, o IGF-I, convergem com as vias de sinalização da insulina (DOMINICI *et al.*, 2005).

A exposição crônica a um excesso de GH está associada à redução na resposta à insulina em termos de fosforilação do IR, IRS-1 e IRS-2, associação p85-IRS-1 e atividade da PI3K no músculo esquelético. Em contraste, o excesso de GH leva a ativação crônica da via IR/IRS-1/PI3K no fígado, bloqueando a ativação induzida pela insulina; sugerindo ser o fígado o local primário de resistência à insulina frente ao GH. A inibição da sinalização da insulina no músculo esquelético por exposição crônica ao GH parece envolver uma maior quantidade da subunidade p85 da PI3K, uma proteína que exerce um papel negativo sobre a sinalização da insulina. A modulação da ação da insulina pelo GH também parece envolver mecanismos de atenuação do sinal da insulina como maior expressão de proteínas SOCS e maior fosforilação do IRS-1 e resíduos de serina (Ser). A modulação da expressão de algumas adipocitocinas como a adiponectina e visfatina também podem exercer um papel na resistência insulínica promovida pelo GH (DOMINICI *et al.*, 2005). A **figura 4** ilustra as vias de sinalização cruzadas entre a insulina, GH e IGFs envolvidas na resistência insulínica promovida pelo GH.



**Figura 4** – Inter-relações entre a sinalização do GH, IGF-1 e insulina em células alvo (DOMINICI *et al.*, 2005).

Os avanços nas tecnologias disponíveis e nos estudos de manutenção nutricional do paciente diabético, associados à maior consciência dos proprietários com relação à posse responsável e ao maior cuidado dos veterinários com doenças concomitantes como as infecções do trato urinário e de doenças periodontais, vêm contribuindo para o maior sucesso da terapia à longo prazo dos animais diabéticos e conseqüente redução de mortalidade (GUPTILL *et al.*, 2002).

## **Ciclo Estral Canino**

A cadela é considerada uma espécie monoéstrica sazonal, apresentando tipicamente um ciclo estral a cada 7 meses, podendo haver intervalos interestrals de 4 a 13 meses em decorrência de variações individuais, nutricionais, sazonais e raciais (HOFFMANN *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2003; FELDMAN & NELSON, 2004). O ciclo estral de uma forma geral é caracterizado por 4 fases distintas (pró-estro, estro, diestro e anestro) e a duração de um ciclo estral corresponde ao período entre o começo de um estro e a nova ocorrência de estro. O intervalo inter-estral corresponde ao período entre o fim de um estro e o começo de um novo pró-estro. As fases do estro e pró-estro assemelham-se à fase proliferativa (ou estrogênica) do ciclo menstrual, enquanto a fase do diestro corresponde à fase secretora (ou lútea) do ciclo menstrual (HOFFMANN *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Apesar das cadelas apresentarem ciclos ovarianos ao longo do ano, há uma certa preferência evolucionária poraios no final do inverno e começo da primavera, de forma a que os filhotes nasçam em um ambiente mais favorável. À medida que os fêmeas caninas vão envelhecendo (a idade ideal para procriação dura aproximadamente 7 anos) várias mudanças podem ocorrer, como por exemplo, o progressivo aumento no intervalo inter-estral, redução no tamanho das ninhadas, aumento na ocorrência de defeitos congênitos e problemas no parto. Entretanto, cadelas saudáveis seguem ciclando durante toda a vida, diferentemente da espécie humana que experimenta a menopausa (parada na atividade reprodutiva) (FELDMAN & NELSON, 2004).

O pró-estro é o período de acentuada atividade folicular que precede o estro, quando os machos são atraídos pelas fêmeas, no entanto elas recusam a cópula. O começo desta fase é usualmente, e de forma mais confiável, definido quando sangramento vaginal inicia e termina quando a fêmea permite que o macho monte e copule (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002). Critérios adicionais aplicados ao início e ao final do pró-estro incluem alterações nas paredes da mucosa vaginal verificadas por endoscopia ou alterações na citologia esfoliativa das células do epitélio vaginal (VANNUCHI *et al.*, 1997). A duração desse período é normalmente entre 6 e 11 dias (média de 9), no entanto, variações de 2 a 25 dias podem ser observadas (HOFFMANN *et al.*, 1996; CONCANNOM *et al.*, 1989).

No pró-estro, clinicamente fica marcante a atração dos machos pela a fêmea, em parte, devido à secreção de feromônios, no entanto, não ocorre a monta. Ao longo do pró-estro, a fêmea vai perdendo sua atitude anti-sexual e passa a ficar mais receptiva, já procurando e brincando com os machos. A descarga vaginal sanguinolenta, freqüentemente observada nas fêmeas durante o pró-estro, começa em decorrência da diapedese de eritrócitos a partir do endométrio e do sub-epitélio vaginal por ruptura de capilares por influência do estrógeno. O sangue desce pela cérvix que se encontra relaxada e escorre pela vulva. A vulva normalmente encontra-se ingurgitada e aumentada de tamanho em decorrência do acúmulo de líquido, o que ajuda a prevenir a penetração de um macho. Ao longo do pró-estro a vulva vai tornando-se mole e suave (FELDMAN & NELSON, 2004).

A cadela em pró-estro está sob influência do estrogênio sintetizado e secretado pelos folículos em desenvolvimento. Durante o final do anestro ocorrem pulsos de secreção de FSH e

LH em concordância. Durante o início do pró-estro há uma maior secreção de FSH, acompanhada por uma maior secreção de LH (FELDMAN & NELSON, 2004). Os folículos que se desenvolvem frente a estas gonadotropinas secretam estrógenos que participam na manifestação dos sinais clínicos e comportamentais dessa fase, bem como na preparação uterina para a gestação (THOMPSON, 2006). A concentração média de estrógeno durante o anestro flutua entre 5 e 15 pg/mL, atingindo um pico de até 70 pg/mL entre 24 a 48 horas antes do início do estro. O declínio na concentração sérica de estrógeno desencadeia o estro, retornando a valores basais entre 5 e 20 dias, permanecendo neste patamar até a próxima fase folicular. A concentração de progesterona em cadelas em anestro é pequena (basal, menor que 0,5 ng/mL), permanecendo com valores menores que 1 ng/mL durante o pró-estro (9 dias) (OLIVEIRA *et al.*, 2003; FELDMAN & NELSON, 2004).

Diversos tecidos-alvo sofrem alterações frente ao aumento da concentração de estrógeno no pró-estro. Estas incluem crescimento dos ductos e dos túbulos das glândulas mamárias, engrossamento dos ovidutos e do endométrio, aumento na sensibilidade miometrial, alongamento dos cornos uterinos, relaxamento da cérvix e proliferação do epitélio vaginal (FELDMAN & NELSON, 2004). O principal marcador celular dos esfregaços vaginais do pró-estro são os eritrócitos. No início desta fase a lâmina pode se assemelhar muito à do anestro em função da presença de células parabasais, intermediárias, neutrófilos e bactérias. Com o avanço do pró-estro deixa-se de observar neutrófilos na lâmina, uma vez que o espessamento do epitélio não permite mais a passagem de leucócitos. As células epiteliais vão sendo substituídas por células superficiais nucleadas e anucleadas e no final deste período cerca de 80% da lâmina contém este padrão de células (VANNUCCHI *et al.*, 1997).

A fase do estro é onde a fêmea permite a monta e a cópula do macho. O termo estro deriva da palavra grega *oistrus*, significando “desejo veemente”. O primeiro dia em que a fêmea aceita a monta marca o começo desta fase, que termina quando a fêmea refuga a monta pela primeira vez. Nenhum outro critério define melhor esta fase (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002; FELDMAN & NELSON, 2004). Os sinais clínicos do estro só ocorrem se tiver acontecido um lento aumento na concentração de estrógenos seguida pelo declínio. Este decréscimo na concentração de estrogênio reflete a maturação final dos folículos ovarianos, alguns dias antes da ovulação. Os folículos ovarianos passam a sintetizar mais progesterona do que o necessário para servir como precursor para síntese de estrógeno após dias do começo do pró-estro (CONCANNOM *et al.*, 1989). Em conjunto com a redução na concentração de estrógeno, que começa nas 24-48 horas prévias ao estro, concentrações cada vez maiores de progesterona são observadas no plasma, mantendo-se maior que 2 ng/mL em decorrência da luteinização de células foliculares adicionais. A concentração de progesterona continua aumentando durante o estro e as primeiras semanas do diestro (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Este panorama hormonal (redução no estrógeno e elevação da progesterona) é responsável por dois eventos importantes: (1) a mudança comportamental (*i.e.* aceitação do macho), ocasionada pela elevação e posterior redução da concentração de estrógenos. (2) a intensa retroalimentação no hipotálamo e hipófise, resultante da redução na concentração do estrógeno e elevação da concentração da progesterona, levando à secreção de FSH e principalmente de LH no estro (CONCANNOM *et al.*, 1989).

Desta forma tem-se um aumento da concentração de progesterona antes da formação de um corpo lúteo, o que reforça a idéia de que células foliculares são capazes de secretar progesterona ainda no pró-estro (HOFFMANN *et al.*, 1996; THOMPSON, 2006). A progesterona é importante para manter e intensificar o comportamento de aceitação da monta, característico do estro. A liberação de LH estimulada pela alteração na relação estrógeno/progesterona estimula a ovulação dentro de 24 a 48 horas, e logo após ocorre a formação do corpo lúteo (CONCANNOM *et al.*, 1989). Antes da formação do corpo lúteo, cerca de dois dias depois da ovulação, a concentração de progesterona normalmente está entre 4 e 10 ng/mL. Quando a concentração de estrógeno fica abaixo dos valores basais (15 pg/mL) o estro termina (HOFFMANN *et al.*, 1996; FELDMAN & NELSON, 2004). Isto se reflete no comportamento da fêmea, que passa a rejeitar a monta agressivamente. Também observa-se uma redução na incidência de células superficiais na avaliação da citologia vaginal, bem como redução na largura do epitélio vaginal e no tamanho da vulva. Nesta fase as fêmeas não mais atraem os machos (VANNUCCHI *et al.*, 1997; RODRIGUES & RODRIGUES, 2002).

As alterações hormonais que ocorrem no estro também se refletem no trato genital da fêmea. A ovulação ocorre de 24 a 72 horas após o pico de LH, e o número de oócitos primários (1 a 15) liberados depende de diversos fatores, sendo a raça um dos mais importantes (HOFFMANN *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2003). A cadela é uma das únicas espécies que ovula oócitos primários, que sofrerão meiose somente na luz uterina (THOMPSON, 2006). A ruptura de todos os folículos ovulatórios demora de 12 a 96 horas. No entanto, apesar deste processo não ser perfeito (sincronia de ovulação), os oócitos liberados em momentos diferentes estão no mesmo estágio de desenvolvimento, o que garante que o desenvolvimento embrionário

de todos os fetos ocorra de forma similar (FELDMAN & NELSON, 2004). Os folículos rompidos luteinizam rapidamente e sofrem uma reorganização que dá origem ao corpo lúteo capaz de manter a síntese de progesterona por 2 meses ou mais (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002). Durante este período o útero continua sua preparação para a implantação. O sangramento a partir do endométrio usualmente cessa, contudo, o desenvolvimento glandular e o aumento na irrigação endometrial ainda não estão completos (FELDMAN & NELSON, 2004).

A duração do estro é de usualmente 5 a 9 dias, no entanto, variações de 1 a 20 dias já foram observadas (CONCANNOM *et al.*, 1989; HOFFMANN *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2003). De uma forma resumida; no primeiro dia do estro há aumento dos valores de progesterona e redução nos níveis de estrógeno, resultando no comportamento passivo frente ao macho, o dia 2 do estro está associado ao pico de LH, sendo o dia 3 o de maturação final dos folículos. A ovulação ocorre entre os dias 4 e 7, enquanto entre os dias 5 e 9 ocorre a maturação dos oócitos primários em oócitos secundários que podem se fertilizados. O dia 10 normalmente é o primeiro dia do diestro (HOFFMANN *et al.*, 1996; FELDMAN & NELSON, 2004).

A citologia vaginal do estro é relativamente constante, com as células superficiais e escamas anucleadas respondendo por 80 a 100% das células observadas no esfregaço. Não são observados neutrófilos e eritrócitos são raros (VANNUCCHI *et al.*, 1997). A secreção vaginal observada nesta fase pode apresentar glicose em decorrência da intolerância aos carboidratos induzida pela progesterona (FELDMAN & NELSON, 2004).

O diestro é definido como a fase de predomínio da progesterona após o estro; onde a fêmea esta “fisiologicamente grávida”. Esta fase começa com a recusa de cópula e termina quando a concentração sérica de progesterona declina a valores menores que 1 ng/mL, sinalizando um retorno à fase de repouso do eixo hipófise-ovário (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Após a síntese do corpo lúteo a concentração de progesterona continua aumentando durante as primeiras duas a três semanas de diestro, seguindo-se um platô (valores entre 15 – 90 ng/mL) por mais uma a duas semanas (HOFFMANN *et al.*, 1996; FELDMAN & NELSON, 2004).

As fêmeas nesta fase, mesmo não prenhes, são consideradas “pseudogestantes”, uma vez que não há um sistema de reconhecimento da gestação na espécie canina. Desta forma, o corpo lúteo permanece ativo o tempo de uma gestação, apesar de não haver fetos (THOMPSON, 2006). Na verdade o corpo lúteo da fêmea não prenhe é funcional por mais tempo (10 a 30 dias a mais) que o corpo lúteo de uma fêmea gestante, que é abruptamente lisado por ação das prostaglandinas no processo do parto. Evidências apontam as prostaglandinas como único fator luteolítico, tanto em cadelas prenhes como em “pseudogestantes” (FELDMAN & NELSON, 2004). O LH é luteotrófico, mantendo a função do corpo lúteo canino especialmente na primeira fase do diestro. O aumento na concentração plasmática de prolactina aparece como um fator luteotrófico na segunda metade do diestro (HOFFMANN *et al.*, 1996; RODRIGUES & RODRIGUES, 2002). O aumento da prolactina, associado com uma leve redução na progesterona estimula a lactação e galactorrêia em muitas fêmeas caninas. Algumas fêmeas podem apresentar comportamento maternal, onde adotam e protegem filhotes de outros cães,

animais de outras espécies ou até mesmo objetos inanimados em um quadro clínico determinado de pseudociese (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Foram demonstradas alterações no padrão de secreção pulsátil de GH durante o diestro, com maiores concentrações séricas com menos pulsos (KOOISTRA *et al.*, 2000). Este fenômeno é provavelmente causado por uma supressão parcial da liberação de GH pela hipófise em decorrência da produção mamária de GH induzida pela progesterona. Este GH mamário, além de efeitos autócrinos e parácrinos sobre a glândula mamária (proliferação e diferenciação da glândula durante o diestro) também apresenta um papel endócrino sobre as transformações hiperplásicas do endométrio e na resistência à insulina (SELMAN *et al.*, 1994; KOOISTRA *et al.*, 2000). Apesar de se considerar o perfil hormonal de cadelas prenhes e não-prenhes semelhante; nas prenhes observa-se maiores concentrações de relaxina de origem placentária, entre a sexta e a sétima semana de gestação. Neste período, nas prenhes, também observa-se um aumento súbito na concentração de estrógeno; que era basal desde o final do estro. Estas alterações estão envolvidas no começo do parto (FELDMAN & NELSON, 2004).

Durante a fase lútea do ciclo, a progesterona promove e mantém o crescimento endometrial e a atividade glandular, suprime a atividade do miométrio e a função leucocitária intra-uterina, fatores importantes para a manutenção da gestação, independente da presença de fetos (THOMPSON, 2006). O tamanho máximo do útero não gestante é atingido cerca de 20 a 30 dias após o início do cio, coincidindo com o período de maior secreção de progesterona. Ao final do diestro a involução uterina demora de 1 a 3 meses, representando um dos possíveis fatores envolvidos no período inter-estral relativamente grande da espécie (FELDMAN &

NELSON, 2004). A duração do diestro normalmente fica entre 56 e 58 dias em fêmeas prenhes e de 60 a 100 dias em não prenhes (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002).

A citologia vaginal, já no primeiro dia do diestro, apresenta um predomínio de células intermediárias e parabasais, evidenciando uma mudança súbita no perfil hormonal, com algumas células escamosas e superficiais (cerca de 20%). Também aumenta a presença de neutrófilos no esfregaço vaginal. Algumas células características desta fase (chamadas de célula do metaestro, que são células intermediárias com um neutrófilo intra-celular) podem ser observadas também. A presença de grupos de células parabasais é comum. Ao final do diestro, a citologia vaginal assemelha-se a observada no anestro (VANNUCCHI *et al.*, 1997).

Por definição, a fase do anestro é a fase de involução uterina. Clinicamente não há nenhuma alteração que permita distinguir o término do diestro e início do anestro em fêmeas não prenhes. Nas fêmeas prenhes, o anestro vai do parto até o próximo pró-estro, com uma duração média de 4,5 meses; uma vez que a fêmea tipicamente apresenta um pró-estro a cada 7 meses (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002). Do ponto de vista endócrino; detectam-se alguns picos de FSH e LH durante o anestro. O pico de LH precede o pró-estro, enquanto os aumentos esporádicos de FSH estão envolvidos com o recrutamento de folículos para o próximo ciclo (THOMPSON, 2006). Também ocorrem picos na concentração basal de estrógeno como decorrência das ondas foliculares estimuladas pelo FSH (THOMPSON, 2006). Em contraste, a progesterona permanece em concentrações normalmente inferiores a 0,5 ng/mL (FELDMAN & NELSON, 2004).

## **Complexo Hiperplasia Endometrial Cística - Piometra**

O complexo da hiperplasia endometrial cística – piometra (HEC-P) é uma enfermidade mediada por hormônios, ocorrendo tipicamente no diestro. O termo piometra designa uma infecção intra-uterina bacteriana purulenta, que resulta em bacteremia e toxemia moderada a severa com risco de vida se não tratada (NOAKES *et al.*, 2001; NISKAMEN & THRUSFIELD, 1998). Geralmente, o útero sofre uma condição patológica prévia à infecção bacteriana (piometra). Esta condição é chamada hiperplasia endometrial cística (HEC). Assume-se que a HEC seja causada, em parte, por uma resposta uterina anormal à exposição crônica e repetida à progesterona (SMITH, 2006). Mesmo assumindo-se que a HEC predispõe à piometra; pode haver piometra sem ocorrência prévia de HEC, o que motiva discussões com relação à classificação do complexo hiperplasia endometrial cística - piometra como duas entidades diferentes (HEC ou piometra) (BOSSCHERE *et al.*, 2002; BIGLIARDI *et al.*, 2004).

Após a ovulação (9 a 12 semanas) a concentração de progesterona mantém-se em valores superiores a 40 ng/mL, enquanto no anestro, a concentração não ultrapassa 0,5 ng/mL. Durante esta fase a progesterona promove e suporta o crescimento endometrial e a secreção glandular, ao mesmo tempo em que suprime a atividade miometrial; permitindo o acúmulo de secreções glandulares no útero. Estas secreções são um excelente meio de cultura para o crescimento bacteriano, sendo o quadro agravado pela inibição da resposta leucocitária uterina por ação da progesterona. Frequentemente, as bactérias envolvidas no quadro patológico da piometra são as mesmas observadas na flora vaginal (SMITH, 2006). Essas bactérias passam através da cérvix e são encontradas dentro do útero durante as fases do pró-estro e estro. No

entanto, além da presença das bactérias e de um útero marcado pela progesterona, outros fatores agem para que ocorra a síndrome, uma vez que nem todas as cadelas em diestro sofrem dessa afecção (FELDMAN & NELSON, 2004; SMITH, 2006).

Durante o diestro, ocorre uma hiperplasia do endométrio induzida pela progesterona. Nesta fase do ciclo estral, as glândulas endometriais sofrem hiperplasia e hipertrofia, tornando-se convolutas e revestidas de epitélio colunar alto. Este epitélio sofre uma lenta degeneração gordurosa à medida que glicogênio vai sendo sintetizado e armazenado (GALABOVA *et al.*, 2003). Van Cruchten *et al.* (2004) demonstraram alterações no estroma, vasos sanguíneos e criptas durante a proliferação do endométrio. No entanto, quando a hiperplasia torna-se patológica aparecem cistos. O epitélio da mucosa torna-se tortuoso e com citoplasmas hipertróficos e claros. O estroma torna-se edematoso e um infiltrado inflamatório está invariavelmente presente (Van CRUCHTEN *et al.*, 2004).

Em cadelas saudáveis, ocorre uma “down-regulation” dos receptores de estrógeno (ER) frente às concentrações crescentes de progesterona. Entretanto, este mecanismo parece falhar em cadelas com HEC, onde a expressão do ER não sofre alterações significativas (DHALIWAL *et al.*, 1999). Como conseqüência, o endométrio continua responsivo a pequenas flutuações de estrógenos; o que pode resultar em proliferação das glândulas endometriais durante um estágio onde há uma forte influência da progesterona (BOSSCHERE *et al.*, 2002). Ververidis *et al.*, (2004) concluíram que a progesterona é o principal hormônio envolvido tanto na regulação de receptores de estrógeno como de progesterona durante o diestro e o anestro em úteros saudáveis e afetados pela síndrome. No entanto, os valores elevados de progesterona

durante o diestro em cadelas com HEC-P aparentemente leva a uma forte *down-regulation* dos PR e também dos ER (VERVERIDIS et al., 2004).

De Cock *et al.* (2002) propuseram um papel para o IGF-I na patogênese da HEC, uma vez que foi observada maior concentração deste fator de crescimento na superfície endometrial; epitélio glandular e estroma em cadelas com HEC comparadas àquelas do grupo controle. A regulação da produção de IGF-I, localmente, dá-se por uma fina interação entre estrógeno e progesterona. O IGF-I pode modular a resposta desses hormônios no útero. Um possível papel do GH sobre a regulação do IGF-I local uterino é pouco provável (De COCK *et al.*, 2002). Kooistra *et al.*, (1997) demonstraram não haver relação entre produção local de GH no desenvolvimento da HEC.

A superfície apical das células epiteliais do lúmen uterino é recoberta por mucinas, que agem lubrificando e protegendo a mucosa contra infecções microbianas (ISHIGURO *et al.*, 2007). A Muc1 é uma mucina trans-membrana da superfície celular; sendo um dos principais componentes do glicocálix, atuando como uma molécula anti-adesiva. Especula-se que a Muc1 sofra uma *down-regulation* no período de implantação do embrião (ISHIGURO *et al.*, 2007). Esta hipótese foi suportada pelo fato da Muc1 sofrer uma *down-regulation* por volta do décimo dia do diestro. Nesta fase do diestro também foram demonstrados elevados valores de progesterona e maior aderência e crescimento de bactérias no epitélio uterino. Fora deste período (fase inicial do diestro) observam-se valores de Muc1 constantes. No entanto, foi demonstrada a redução na expressão da Muc1 em cadelas com piometra. Desta forma a *down-regulation* da Muc1 promovida pela progesterona pode ser um fator importante na evolução da

piometra; uma vez que um útero mais sensível a progesterona pode permitir um maior crescimento bacteriano em decorrência da menor expressão de Muc1 (ISHIGURO *et al.*, 2007).

Leitner *et al.* (2003) identificaram reduzidos índices de ligação de lectinas (boa ferramenta para identificar glicoconjugados) no endométrio de cadelas com HEC-P, possivelmente em decorrência de exaustão glandular após a HEC. A aderência bacteriana aos resíduos de açúcares na HEC-P também justifica a reduzida ligação das lectinas. As alterações que começam com a HEC, caracterizada por excessiva produção de glicoconjugados, podem levar a piometra promovendo um ambiente favorável para adesão e crescimento bacteriano após exaustão glandular, uma vez que os resíduos de açúcares na superfície apical das células funcionam como sítios alvo para aderência bacteriana (LEITNER *et al.*, 2003).

A aderência das bactérias depende da presença de certos carboidratos no glicocálix e observou-se uma inibição na produção e na expressão de carboidratos no início do diestro, contrariamente a outras fases (fim do diestro e anestro). Contudo, a presença de hialuronidase (enzima que degrada glicoproteínas) aumenta pouco a aderência bacteriana o que reflete a diversidade de atividade de enzimas e a complexidade destas interações sobre os vários tipos de mucinas (ISHIGURO *et al.*, 2007).

A hiperplasia endometrial, ocasionalmente, resulta no acúmulo de fluido fino ou viscoso dentro do útero (FELDMAN & NELSON, 2004). A presença deste fluido no útero recebe o nome de hidrometra ou mucometra conforme o conteúdo de mucina do fluido. A piometra é a complicação mais comum da HEC; que também pode causar, porém menos

frequentemente; infertilidade ou endometrite crônica. O diagnóstico de HEC é pouco comum pois os sintomas só aparecem após a contaminação do fluido uterino (piometra) (FELDMAN & NELSON, 2004).

As bactérias mais comumente encontradas são as observadas na flora vaginal, como a *E.coli*, que ascendem ao útero durante as fases do pró-estro e do estro. Estafilococcus, estreptococcus, *Klebsiela*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Haemophilus*, *Pasteurela*, *Serratia* e outras bactérias já foram isoladas de úteros de cadelas com piometra (FELDMAN & NELSON, 2004; WEISS *et al.*, 2004). Outras fontes de contaminação uterina foram sugeridas; como as infecções urinárias e/ou bacteremias concomitantes (SMITH, 2006). A presença prévia da HEC, elevação da concentração de progesterona no diestro, ou ainda uso de progestágenos ou estrógenos exógenos são alguns fatores que quando presentes contribuem ao desenvolvimento de piometra (NOAKES *et al.*, 2001).

A bactéria predominante *E.coli* pode aderir ao endométrio e miométrio via sítios antigênicos específicos estimulados pela progesterona. Endotoxinas lipopolisacarídicas (LPS), quimicamente estáveis e biologicamente ativas estão presentes na membrana celular da *E.coli*. Esta endotoxina é liberada quando a bactéria morre e se desintegra. Endotoxemia clínica ocorre quando a concentração sérica de LPS ultrapassa 0,05 ng/mL. A dose letal é de 0,7 ng/mL. Os sinais clínicos de endotoxemia (hipotermia, desorientação e sinais de choque séptico) podem piorar frente ao uso de antibióticos, uma vez que supostamente estão promovendo um aumento na mortalidade bacteriana (FELDMAN & NELSON, 2004).

A HEC-P, tradicionalmente, trata-se de uma doença de prevalência em cadelas de meia-idade ou idosas, com mais de 6 anos de idade. Tratar-se de um quadro cumulativo decorrente de anos de exposição e de estimulação do útero pela progesterona, como parte de cada ciclo ovariano (SMITH 2006). Também um grande número de fêmeas apresentam a HEC-P jovens, algumas após o primeiro cio. A ocorrência deste quadro em cadelas jovens não pode ser explicada por exposição crônica à progesterona e freqüentemente é associada ao uso de progestágenos como anticoncepcionais, ou de estrógenos como abortivos / inibidores da implantação após uma cópula indesejada (NOAKES *et al.*, 2001; SMITH 2006). O estradiol estimula o aumento do número de receptores de progestágenos no útero, tornando-o hiper-responsivo à progesterona (FELDMAN & NELSON, 2004). Apesar disto, observa-se fêmeas jovens com piometra que jamais foram expostas aos hormônios exógenos, em decorrência de cistos ovarianos foliculares (FAYRER-HOSKEN *et al.*, 1992) ou ainda sem nenhuma condição patológica associada.

Provavelmente outros fatores além dos acima citados estão envolvidos na evolução da HEC-P; como por exemplo, a competência imunológica da fêmea, a virulência da cepa bacteriana presente no útero e a sensibilidade do útero aos efeitos da progesterona (FELDMAN & NELSON, 2004). Algumas raças apresentam maior risco de desenvolver piometra; como por exemplo, o Rottweiler, São Bernardo, Collies, Golden Retrievers. Outras raças como o Dashchund e cães sem raça definida apresentam risco reduzido de desenvolvimento de HEC-P (NISKEM & THRUSFIELD, 1998).

Niskem & Thrusfield (1998) em estudo realizado na Finlândia, observaram que fêmeas nulíparas apresentam um risco maior de desenvolver piometra que fêmeas primíparas ou múltiparas (*odds ratio* ajustado 6,63) e que a idade média de desenvolvimento de piometra seria por volta dos 9 anos. Dow (1959) observou que cerca de 75% das fêmeas com piometra eram nulíparas. A administração de estrógenos aumentou a chance de cadelas com mais de 4 anos desenvolverem piometra em mais de seis vezes. Nenhum risco significativo foi observado em decorrência de tratamentos com acetato de medroxiprogesterona (progestina mais usada nas rotinas clínicas) desde que a dose (1 a 5 mg/kg) e o intervalo de aplicação (semestral) sejam respeitados (Niskem & Thrusfield, 1998), uma vez que nos modelos de indução de HEC as doses são maiores (10 mg/kg) e os intervalos menores (cada 3 semanas) (KOOISTRA *et al.*, 1997).

Pacientes com piometra de cérvix aberta apresentam descarga vaginal sanguinolenta a muco-purulento de 4 a 8 semanas após o estro (SMITH 2006). Outros sinais incluem poliúria, polidipsia, letargia, depressão, inapetência, vômitos e diarreia. No entanto, as cadelas com piometra de cérvix aberta frequentemente apresentam-se com um bom aspecto geral apesar da descarga vaginal (FELDMAN & NELSON, 2004). As fêmeas com piometra de cérvix fechada, frequentemente apresentam-se bastante debilitadas em decorrência da ausência de um sinal clínico que indique aos proprietários algum problema (WEISS *et al.*, 2004; SMITH 2006). Nestes casos, a queixa do proprietário normalmente refere à perda de apetite, poliúria, polidipsia, letargia, depressão, aumento de volume abdominal e perda de peso. Ocasionalmente, ocorre a abertura da cérvix após o desenvolvimento de sinais clínicos mais severos, observando-se intensa descarga vaginal (FELDMAN & NELSON, 2004).

Estes sinais associados aos vômitos e à diarreia podem evoluir para septicemia progressiva e toxemia, com conseqüente desidratação progressiva, choque, coma e morte caso o animal não for tratado (SMITH 2006). A severidade do quadro depende da capacidade do proprietário em observar precocemente sinais que possam indicar a presença de um quadro patológico como a piometra. Apesar da possibilidade de tratamento clínico com moduladores da atividade do miométrio e de antibióticos, nenhum tratamento é mais efetivo do que a castração (ovário-salpingo-histerectomia) (CORRADA *et al.*, 2006; GOBELLO 2006; FIENE 2006, SMITH 2006).

Não é possível correlacionar agente etiológico, grau de lesão uterina e dosagens hormonais com a ocorrência de piometra de cérvix aberta ou fechada (WEISS *et al.*, 2004). A ultra-sonografia apresenta-se como a melhor ferramenta auxiliar no processo de diagnóstico; permitindo inclusive, de acordo com experiência do ultra-sonografista e a qualidade do aparelho, distinguir os diferentes tipos de classificação da HEC-P propostas por Dow (1959ab) e Bosschere *et al.* (2002).

### **Resposta Inflamatória e a Sensibilidade à Insulina**

A ocorrência da síndrome *sepsis* associada a piometra é bastante comum e os sinais cardiais desta síndrome resumem-se a (1) taquipnéia ou taquicardia, (2) hipertermia ou hipotermia, (3) leucocitose ou (4) leucopenia (BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996; BASSO *et al.*, 2006). A dosagem da proteína C reativa é um indicador de diagnóstico e prognóstico

nesses casos, por se tratar de uma proteína de fase aguda de inflamação. A determinação da proteína C reativa permite a diferenciação entre HEC e piometra com 97% de probabilidade quando associada aos sinais clínicos e a presença de desvio neutrofílico à esquerda no hemograma (FRANSSON *et al.*, 2004).

Ao longo dos últimos anos, o conhecimento das interações entre o sistema imune e o sistema endócrino tem aumentado, sendo a interação entre a IL-1 e o metabolismo da glicose um dos principais exemplos (BESEDOWSKI & Del REY, 1989). A citocina IL-1 $\beta$  reduz a ligação e a fusão de grânulos secretores de insulina em células  $\beta$  pancreáticas, com decréscimo preferencial da primeira fase de exocitose; característica da fase pré-diabética do diabetes (DM) tipo I (OHAHA-IMAIZUMI *et al.*, 2004). O fenômeno da glicotoxicidade parece envolver a produção de IL-1 $\beta$  pelas células  $\beta$  pancreáticas em resposta à hiperglicemia (MAEDLER *et al.*, 2002). Também foi demonstrado o papel da IL-1 na estimulação de necrose das células  $\beta$  pancreáticas (STEER *et al.*, 2006) e a predisposição à maior vulnerabilidade das células  $\beta$  à destruição auto-imune (WACHLIN *et al.*, 2003).

Durante o desenvolvimento do DM tipo I diversas citocinas como a IL-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  medeiam a disfunção e a degeneração das células  $\beta$ , em parte pela indução da óxido nítrico sintase (iNOS) e produção de NO pelas células  $\beta$  (HEITMEIER *et al.*, 2004). A destruição imunomediada das células  $\beta$  segue dois passos básicos. Um evento inicial que resulta na liberação de antígenos específicos pelas células  $\beta$  e posteriormente a morte celular mediada pela ação dos linfócitos T. A IL-1 está envolvida na liberação do antígeno HMGB1 e conseqüente na indução da morte celular imunomediada (STEER *et al.*, 2006)

A sinalização inflamatória apresenta vias cruzadas com a sinalização da insulina, sendo o IRS-1 um dos pontos onde a interação entre estas duas vias pode ocorrer, ajudando na explicação da resistência à insulina em processos inflamatórios, como por exemplo, a fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina (KIM *et al.*, 2005). Estudos demonstram uma inibição da fosforilação do IRS-1 e associação com o fosfatidilinositol 3-quinase em resposta a IL-1 $\alpha$  em adipócitos (HE *et al.*, 2006). Jager *et al.* (2006) demonstraram uma menor expressão do IRS-1 induzida pela IL-1 $\beta$ .

A ativação do NF- $\kappa$ B, bem como elevadas concentrações e/ou ativação de substâncias como o fator de inibição de migração (MIF), fator de necrose tumoral (TNF), IL-1, IL-6, radicais livres, óxido nítrico indúzível (iNO) e a hiperglicemia de estresse, são alguns dos fatores que induzem a resposta inflamatória e a redução da função do miocárdio observada em quadros sépticos. A insulina, assim como outras substâncias, apresenta a habilidade de suprimir a síntese de MIF, TNF, IL-1, IL-6 e de radicais livres, e aumentar a produção de interleucinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4. Além do mais, a insulina corrige a hiperglicemia induzida por estresse e melhora a função do miocárdio (DAS, 2003); o que suporta o uso clínico de insulina com ou sem potássio não só no controle glicêmico, mas também como um modulador do processo inflamatório (DAS, 2003b). Contudo, pacientes em choque séptico podem apresentar hiperinsulinemia em decorrência da resistência à insulina induzida pelo quadro inflamatório (KOGIKA *et al.*, 2001). Os mediadores da resposta inflamatória (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) iniciam mudanças metabólicas no organismo para suprir de nutrientes o sistema imune. Estas mudanças incluem hiperlipidemia e aumento da atividade gliconeogênica (GRIMBLE, 2002). No sistema

nervoso central a IL-1 reduz o ponto de ajuste da glicemia, promovendo hipoglicemia. Esta regulação negativa do glucostato hipotalâmico, associado as ações periféricas da IL-1 podem favorecer a captação de glicose pelas células imunes durante a resposta inflamatória (Del REY, 2006).

Estados inflamatórios crônicos como a periodontite, doença mais freqüente em cães, atingindo cerca de 80% da população canina, aumentam os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas podem induzir resistência à insulina, como observada no diabetes. Também essas substâncias estariam envolvidas no início da destruição imunomediada das células  $\beta$  (IACOPINO 2001). Syrenicz *et al.*, (2006) demonstraram que estados inflamatórios sub-clínicos são importantes coadjuvantes na etiologia do diabetes, especialmente do DM tipo II, uma vez que estão associados a fatores como resistência à insulina, valores elevados de HbA1c, dislipidemia, hipertensão, histórico familiar de DM tipo II, sedentarismo e dieta rica em gordura e em carboidratos.

Krook *et al.* (1960) observaram uma maior prevalência de piometra e de diabetes em cães com sobrepeso ou obesos. A maior interconversão de hormônios esteróides sexuais pelo tecido adiposo, bem como o estado pró-inflamatório encontrado em pacientes obesos em decorrência de diversas citocinas inflamatórias produzidas pelos adipócitos, poderiam estar associadas a maior prevalência de piometra em pacientes com elevada adiposidade (COSTA & DUARTE, 2006; TILG & MOSCHEN, 2006).

## **OBJETIVOS**

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a influência das diferentes fases do ciclo estral e do complexo hiperplasia endometrial cística – piometra sobre a sensibilidade à insulina, em fêmeas caninas atendidas na rotina do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **Objetivos Específicos**

Para atingir o objetivo principal do estudo, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

1. Avaliar parâmetros de patologia clínica como hematologia e dosagem de metabólitos sanguíneos como lipídeos e proteína glicosilada.
2. Avaliar a sensibilidade à insulina em cadelas em anestro, estro e diestro ou com HEC-piometra por meio de teste de tolerância intravenoso à glicose (IVGTT) e cálculo de índices de sensibilidade à insulina e funcionalidade das células  $\beta$ .
3. Avaliar a concentração de glicogênio muscular das pacientes dos diferentes grupos experimentais como indicador do efeito metabólico celular da insulina.

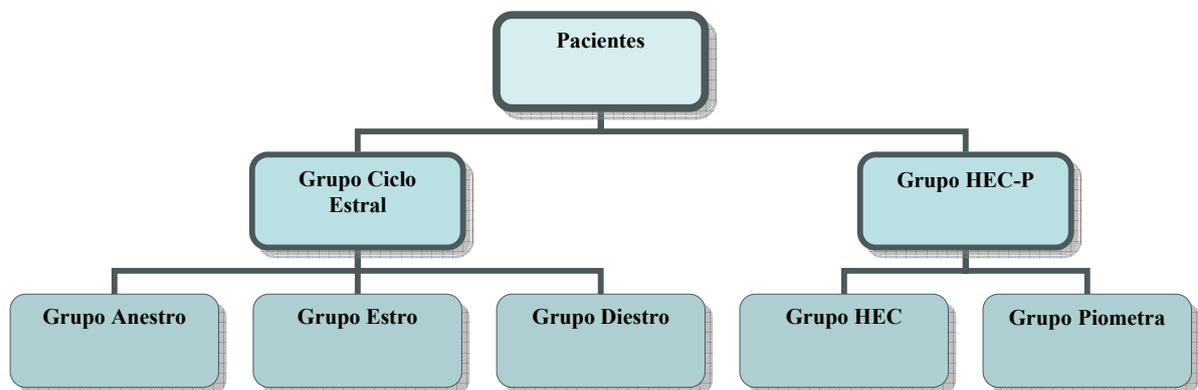
4. Estimar a capacidade de ligação à insulina e constantes de dissociação hormônio-receptor da insulina em tecido muscular esquelético das pacientes nos diferentes grupos de estudo por meio de estudos de *binding*.
  
5. Determinar a capacidade de fosforilação do receptor insulínico por meio da fosforilação do substrato sintético Poly (Glu;Tyr).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Delineamento Experimental

Estudo transversal controlado em fêmeas caninas apresentadas para atendimento por preocupação de seus proprietários com relação à “castração” (ovário-salpingo-histerectomia - OSH); ou pela apresentação de um quadro clínico de hiperplasia endometrial cística – piometra (HEC-P).

As pacientes foram divididas em grupos (**Figura 5**), conforme o estágio do ciclo estral (anestro, estro ou diestro) ou condição patológica (hiperplasia endometrial cística (HEC) ou grupo piometra).



**Figura 5.** Divisão dos grupos de estudo.

## **Animais**

Cinquenta e sete cadelas foram avaliadas para participação no estudo no período de 23 de janeiro de 2006 a 18 de janeiro de 2007 no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Destas; trinta e oito pacientes foram avaliadas na ação de extensão universitária Controle Reprodutivo de Cães e Gatos (Registro nº 00007195/116, Proc. 230780049710662 Pró-Reitoria de Extensão / UFRGS) realizada no HCV / UFRGS, sendo divididas em anestro, estro ou diestro conforme histórico reprodutivo, exame físico, citologia vaginal e resultados de histopatologia uterina. As demais dezoito pacientes foram avaliadas na rotina de atendimentos do HCV / UFRGS, após o diagnóstico de HEC-P, sendo posteriormente divididas nos grupos HEC ou piometra conforme resultados da histopatologia uterina segundo critérios sugeridos por Dow (1957); sendo os estágios I e II considerados como HEC somente, e os estágios III e IV considerados como piometra.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade (CEP/UFRGS - projeto nº 2006622) e pela Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (COMPESQ/ICBS) sob Processo protocolo número 23078.021084/06-40. A realização deste estudo no referido hospital também estava de acordo com a Direção da entidade.

Foram aplicados como critérios de inclusão para o grupo ciclo estral os seguintes aspectos: peso superior a 6 kg; hemograma sem alterações, ausência de doenças ou uso concomitante de medicamentos, condição corporal eutrófica e não exposição a progestágenos ou

estrógenos exógenos nos últimos 6 meses. Para o grupo HEC-P além de peso superior a 6 kg, ausência de doenças concomitantes, condição corporal eutrófica e não exposição a progestágenos ou estrógenos exógenos nos últimos 6 meses. Também foram adotados como critérios de inclusão neste grupo, hemograma com leucocitose e neutrofilia, e não uso de soluções glicosadas no tratamento inicial do complexo HEC-P. Uso de antibióticos após o diagnóstico inicial não foi considerado critério de exclusão.

Após avaliação criteriosa do total de 57 pacientes, 13 animais foram excluídos do banco de dados inicial, permanecendo as demais 44 assim distribuídas, conforme histórico reprodutivo e resultados de citologia vaginal e histopatologia uterina: grupo anestro (n = 11 animais); grupo estro (n = 7 animais); grupo diestro (n = 14 animais); grupo HEC (n = 5 animais) e grupo piometra (n = 12 animais).

### **Protocolo Experimental**

Os animais que chegavam para consulta pela ação de Controle Reprodutivo de Cães e Gatos passavam por uma avaliação clínica, e os proprietários respondiam à anamnese e a um questionário com informações a respeito da vida pregressa do animal com relação a histórico reprodutivo, histórico alimentar, histórico de saúde e nível de atividade física (**anexo 1**). Nesta ocasião apresentava-se o presente projeto de pesquisa aos proprietários dos animais, e a autorização para a participação da paciente no projeto, era feita por meio de termo de consentimento informado (**anexo 2**). As pacientes com diagnóstico de HEC-P, atendidas no HCV-UFRGS no período de realização do estudo, que se enquadravam nos critérios de inclusão

tinham a participação autorizada pelos donos por meio do mesmo termo de consentimento informado. Esses proprietários também foram questionados com relação às informações do anexo 1, quando estas não haviam sido coletadas no prontuário de atendimento inicial da paciente.

Após esta avaliação inicial; as pacientes do grupo ciclo estral passavam por uma ultrasonografia para confirmação de que não estavam prenhes, quando o histórico reprodutivo suportasse esta hipótese, e em seguida era feita uma colheita de cerca de 3 mL sangue a partir da veia jugular, em tubo com EDTA para determinação de hemograma, plaquetometria (avaliação pré-operatória) e fibrinogênio; e outros 2 mL de sangue em tubo sem anti-coagulante (obtenção de soro) para determinações bioquímicas. Neste momento também era realizada uma citologia vaginal para determinação da fase do ciclo estral em que estava a paciente. As pacientes com diagnóstico de HEC-P também passaram por ultra-sonografia abdominal para confirmação do quadro patológico, coleta de sangue e citologia vaginal.

Uma vez realizada a avaliação inicial e com os resultados dos exames preliminares das pacientes era marcada uma data para realização da OSH eletiva ou como parte do tratamento da HEC-P. No pré-operatório foi realizado um teste de tolerância intravenoso a glicose, com as pacientes mantidas acordadas e sem nenhuma sedação, sendo posteriormente durante o procedimento operatório, coletados tecidos para posterior estudo sobre as características dos receptores insulínicos.

## **Determinações Hematológicas**

Todas determinações hematológicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias do HCV/UFRGS (LACVet). A quantidade total de eritrócitos, leucócitos e hemoglobina foi determinada por diluição do sangue e leitura em contador automático (Celm CC-530, São Paulo, Brasil). O hematócrito foi obtido por centrifugação do sangue total em tubo capilar (10.000 rpm por 5 minutos). Os valores de VGM e CHGM foram calculados (THRALL, 2004). A leucometria diferencial foi determinada por leitura de esfregaço sangüíneo corado pelo método Panótico rápido. A proteína plasmática total foi determinada por refratometria. A plaquetometria foi determinada a partir de contagem em câmara de Neubauer.

## **Citologia Vaginal**

A citologia vaginal foi realizada conforme descrito por Vannucchi *et al.* (1997). Uma haste plástica (*swab*) com ponta recoberta de algodão era umidificada em solução salina estéril, e após limpeza externa da vulva introduzia-se a haste na cavidade vaginal da paciente pela comissura dorsal da vagina em ângulo de 45° em sentido cranio-dorsal. Após, rotacionava-se o *swab* delicadamente sobre a parede dorsal e lateral da vagina. Em seguida o *swab* foi levemente rotacionado sobre uma lâmina de microscopia, sendo esta corada pelo método Panótico rápido, para posterior análise microscópica.

### **Teste de Tolerância à Glicose Intra-Venosa (IVGTT)**

Durante o período pré-operatório as pacientes passaram por um *IVGTT* conforme descrito por Mattheeuws *et al.* (1984). Após um jejum noturno de 8 a 12 horas, as pacientes foram recebidas no HCV/UFRGS para início do teste. Em cada paciente um cateter foi colocado nas veias cefálicas dos membros anterior direito e esquerdo. Após a colocação do primeiro cateter, uma amostra de sangue foi coletada para dosagem de glicemia (uma gota) e para determinação de insulinemia (3 mL de sangue total em tubo sem anti-coagulante) e posteriormente o cateter foi mantido com uma seringa heparinizada para demais coletas de sangue. As determinações de glicemias foram realizadas com glicômetro portátil (*Accu-Check Active*, Roche Diagnóstica, Brasil). Pelo segundo cateter foi administrada uma dose de 500 mg/kg de glicose em menos de 30 segundos; correspondente a 1 mL/kg de uma solução de glicose a 50%. Posteriormente esta via venosa foi mantida por meio de infusão lenta de uma solução de NaCl a 0,9%. Amostras de sangue para determinação de glicemia foram coletadas nos tempos 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 minutos após infusão de glicose. Amostras para determinação de insulinemia foram colhidas nos tempos 5 e 60 após infusão de glicose em tubos sem anti-coagulante; exceto no grupo HEC, onde não foi determinada insulinemia. As amostras colhidas para determinação da concentração de insulina foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, sendo o soro posteriormente separado e congelado a -20°C até posterior análise.

Alguns índices foram calculados com base nos resultados do IVGTT, como os índices HOMA R e HOMA B (MATTHEWS *et al.*, 1985),  $\Delta I/\Delta G$  aos 5 minutos de IVGTT (adaptado de OMORI *et al.*, 1991) além do índice insulinogênico (GUTT *et al.*, 2000) e a relação

insulina/glicose corrigida (FELDMAN & NELSON, 2004). Para cálculo do HOMA R, HOMA B,  $\Delta I/\Delta G$ , índice insulinogênico e relação insulina/glicose corrigida foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{HOMA R} = \frac{\text{Insulinemia } (\mu\text{U/mL}) \times \text{Glicemia } (\text{mmol/L})}{22,5}$$

$$\text{HOMA B } (\%) = \frac{20 \times \text{Insulinemia } (\mu\text{U/mL})}{\text{Glicemia } (\text{mmol/L}) - 3,5}$$

$$\Delta I/\Delta G = \frac{\text{Insulinemia } (\text{pM}) \text{ aos 5 minutos de } IVGTT - \text{Insulinemia basal } (\text{pM})}{\text{Glicemia } (\text{mM}) \text{ aos 5 minutos de } IVGTT - \text{Glicemia basal } (\text{mM})}$$

$$\text{Índice Insulinogênico} = \frac{\text{Insulinemia } (\mu\text{U/mL})}{\text{Glicemia } (\text{mg/dL})}$$

$$\text{Relação Insulina / Glicose Corrigida} = \frac{\text{Insulinemia } (\mu\text{U/mL}) \times 100}{\text{Glicemia } (\text{mg/dL}) - 30}$$

## **Procedimento Operatório e Coleta de Tecidos**

Em seguida ao término do *IVGTT* as pacientes recebiam 3 mg/kg de meperidina (Dolosal® - Cristália) como analgesia pré-operatória por via intra-muscular e 22 mg/kg de ampicilina sódica (Ampicilina Veterinária® - Univet) como antibioticoterapia profilática. Em seguida a anestesia era induzida com 5 mg/kg de propofol (Provine® - Core), seguindo-se intubação oro-traqueal e manutenção do plano anestésico com isoflurano (Forane® - Abbot) à 2% em oxigênio (White Martins).

A OSH foi realizada por técnica padrão (SLATTER, 2007), com utilização de três pinças para ressecção do complexo artério-venoso ovariano (CAVO) de cada lado e ressecção do corpo uterino cranial à cérvix, seguindo-se ligadura dos pedículos ovarianos e coto uterino com fio mononylon. Após a retirada dos ovários e útero, três segmentos uterinos foram colhidos e colocados em formol a 10% (um de cada corno uterino e um do corpo uterino) para análise histopatológica. Amostras do endométrio foram colhidas em tubos tipo eppendorf e congeladas em nitrogênio líquido.

Antes da rafia da parede abdominal, duas amostras de 1 g cada, foram colhidas do músculo reto-abdominal, uma de cada lado, e imediatamente envoltas em papel alumínio, identificadas e congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise. Os tecidos congelados inicialmente em nitrogênio líquido foram mantidos a -80°C até análise.

A sutura da parede abdominal foi realizada de forma rotineira, utilizando-se fio mononylon em padrão de sutura de Sultan interrompido. A redução do espaço-morto subcutâneo foi feita utilizando-se fio mononylon em padrão contínuo simples e a síntese de pele, utilizando-se o mesmo fio, foi feita em padrão intradérmico contínuo. No pós-operatório imediato; as pacientes atendidas no projeto Controle Reprodutivo de Cães e Gatos recebiam 40.000 U/kg de penicilina benzatina (Pentabiótico® - Fort Dodge) por via intra-muscular, como antibioticoterapia pós operatória, e 2 mg/kg de cetoprofeno (Ketofen ® - Merial) por via intra-muscular como analgésico e anti-inflamatório. Estas pacientes recebiam prescrição de continuação do uso do cetoprofeno na dose de 1 mg/kg por mais 2 ou 3 dias por via oral a cada 24 horas, mantendo limpeza diária da ferida operatória com solução salina estéril até retirada dos pontos em média após 10 dias. As pacientes operadas com HEC-P tiveram as recomendações e medicações pós-operatórias prescritas pelos médicos veterinários responsáveis pelo caso de acordo com a necessidade de cada paciente.

### **Histopatologia Uterina**

As amostras de útero coletadas foram processadas no Setor de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária desta Universidade. As amostras colhidas foram clivadas e posteriormente incluídas em parafina líquida. Os blocos de parafina foram posteriormente fatiados em um micrótomo e preparadas as lâminas. Estas foram coradas pelo método da hematoxilina e eosina (HE) segundo Prophet *et al.* (1992). A análise das lâminas foi feita de acordo com critérios descritos por Galabova *et al.*, (2003) e Van Cruchten *et al.*, (2004) para

auxiliar na classificação da fase do ciclo estral; e por Dow (1959a,b) para classificação do complexo HEC-P em HEC não complicada, ou HEC complicada – piometra.

### **Radioimunoensaio e Determinações Bioquímicas**

Para determinação dos valores de insulinemia foi utilizado um Kit de radioimunoensaio para insulina humana (*ImmuChem<sup>TM</sup> Coated Tube Insulin <sup>125</sup>I RIA Kit – MP Biomedicals, LLC Orangeburg, NY*). Após preparação prévia do ensaio, 100 µL de cada padrão de insulina, controles de insulina e amostras foram pipetados nos tubos revestidos de anticorpos anti-insulina. Em seguida 900 µL da solução tampão contendo <sup>125</sup>I-insulina (< 5 µCi) foram adicionados aos tubos, que após agitação foram incubados a temperatura ambiente por 18 horas. Após incubação as amostras foram decantados e lavados com água deionizada e após secagem os tubos vazios tiveram a radioatividade determinada em contador gama LKB. Os valores de cpm de cada amostra foram divididos pelo valor de cpm do padrão 0 µU/mL, gerando a razão %B/B<sub>0</sub>. Os valores das razões %B/B<sub>0</sub> dos padrões de insulina foram utilizados para elaboração de um gráfico, e posteriormente foi determinada a equação de regressão logarítmica da curva apresentando um r<sup>2</sup> no primeiro ensaio de 0,9919 e de 0,9504 no segundo. Os resultados foram expressos em µU/mL. A determinação da insulinemia nas pacientes com HEC, não foi determinada em decorrência das amostras estarem muito hemolisadas e não haver disponibilidade de kits para todas as dosagens.

As concentrações séricas de colesterol total e de triglicerídeos foram determinadas utilizando kits diagnósticos (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por meio de

sistema enzimático por reação de ponto final. As absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro ajustado para leitura do colesterol em 500 nm e 505 nm para a leitura dos triglicerídeos. Os resultados de triglicerídeos e de colesterol sérico foram expressos em mg/dL. Para determinação da concentração sérica de fructosamina foi utilizado o método da redução do azul de nitrotetrazólio (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) com leitura dos resultados em espectrofotômetro ajustado em 530 nm. Os resultados de fructosaminemia foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$ . Também foi determinado o fibrinogênio plasmático das pacientes através de precipitação por calor. Os resultados foram expressos em g/L.

### **Dosagem do Glicogênio Muscular**

O glicogênio foi extraído segundo técnica descrita por Van Handel (1965). Foram utilizados de 50 a 100 mg de tecido muscular de cada paciente. Estes tecidos foram aquecidos a 100°C por 1 hora em 2 mL de KOH a 30%. Após o banho; 5 gotas de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado foram adicionados, seguindo-se adição de 4 mL de álcool. Após homogeneização e centrifugação a 2.700 rpm por 10 minutos descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi dissolvido em 2 mL de água quente, seguindo-se nova adição de 4 mL de álcool. Seguiu-se uma nova centrifugação a 2.700 rpm por 10 minutos com descarte do sobrenadante.

O precipitado foi ressuspensão com 2 mL de água quente. Em uma amostra de 300 µL de glicogênio foi realizada a hidrólise ácida com HCl 4 N. Uma curva padrão de glicogênio foi feita a partir de uma solução de glicogênio (1 mg/mL). Em seguida as amostras e os padrões de glicogênio foram aquecidos a 100°C por 1 hora, resfriados, e 300 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foi adicionado. Após liberação de todo CO<sub>2</sub> formado a dosagem de glicose foi realizada pelo método glicose-oxidase com kit reagente (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro ajustado para leitura na faixa de 505 nm. Os resultados foram expressos como mg de glicogênio em 100 g de tecido.

### **Preparação das Membranas do Tecido Muscular**

As membranas de músculo foram preparadas conforme Kucharski *et al.* (1999) e Orcy *et al.* (2005) com algumas modificações. Para cada preparação de membrana dos experimentos

de fosforilação e ligação, foram utilizados dois animais de cada grupo, escolhendo-se as pacientes conforme similaridade de peso, idade, grupo racial, glicemia e resposta ao *IVGTT*. Os tecidos foram inicialmente picados em pequenos pedaços em solução Krebs Ringer para mamífero (KRM); pH 7,4 a 4°C e posteriormente homogeneizados em um ultra-turrax a 4°C por cerca de 30 segundos em um tampão TES com PMSF (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 250 mM sacarose e 100 mM de PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride*). Este homogenado foi centrifugado inicialmente a 3.000 g (5.000 rpm) por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 30.000 g (16.000 rpm) por 20 minutos a 4°C, sendo o precipitado ressuspensão em 250 a 350 µL de TES com PMSF.

As membranas preparadas para os experimentos de ligação hormônio-receptor (*binding*) foram incubadas por 5 minutos a 25°C em ácido acético 1 mM na proporção de 1/1 (v/v) após ressuspensão do precipitado final como descrito acima. A reação foi interrompida com tampão TES com PMSF na proporção de 2/1 (v/v) (TURYN *et al.*, 1986), seguindo-se nova centrifugação a 30.000 g (16.000 rpm) por 30 minutos a 4°C, sendo o precipitado ressuspensão em 250 - 350 µL de TES com PMSF.

### **Dosagem de Proteínas**

Amostras de 50 µL da solução contendo as membranas foram separadas para a dosagem de proteínas. A concentração de proteínas foi determinada segundo o método de Bradford (1976) com o *Coomassie brilliant blue*, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como controle.

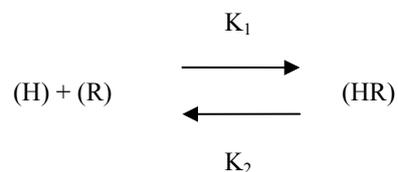
## **Ensaio de Ligação da <sup>125</sup>I-Insulina em Presença de Diferentes Concentrações de Insulina Humana**

Os estudos de ligação com <sup>125</sup>I-insulina foram realizados de acordo com Kucharski *et al.* (1999) com pequenas modificações para o tecido muscular de cães. Para cada amostra de membrana foram utilizados 2 animais de cada grupo e cada ponto das curvas corresponde a uma média de 6 a 8 animais. As soluções de membrana (400 µg de proteína por tubo) foram incubadas em agitador metabólico Dubnoff em um volume final de ensaio de 200 µL, contendo tampão (KRM) pH 7,4 com albumina sérica bovina (BSA) a 1% na presença de concentrações crescentes de insulina regular humana (Eli Lilly) - 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL - mais 20.000 cpm de <sup>125</sup>I -insulina humana (Amersham Bioscience – 2000 Ci/mmol) ou somente na presença de insulina marcada (ligação total). Após 2 horas de incubação a 25°C, o conteúdo dos tubos foi filtrado em filtros de microfibras de vidro (filtro Whatman GF/B 2,4 cm) adaptados a uma bomba de vácuo. Cada filtro foi lavado 5 vezes com 1 ml de KRM 0,1% BSA. Depois de secos a radioatividade retida no filtro (complexo <sup>125</sup>I - insulina humana / receptor) foi contada em contador de gama LKB. Tecido muscular de ratos Wistar foi usado como controle da técnica.

Para análise dos sítios de ligação da insulina foram utilizados os dados da curva de competição (saturação fria) que foram lançados no programa Kell for Windows<sup>TM</sup> (version 6, Biosoft). O método gráfico utilizado para análise dos dados da união de ligandos a proteínas foi o método de Scatchard (SCATCHARD, 1949). O gráfico de Scatchard resulta em uma reta onde

a inclinação da mesma informa sobre a constante de dissociação ( $K_d$ ) e a intersecção da reta com o eixo das abscissas indica a capacidade de ligação ( $B_{max}$ ). Os valores de  $K_d$  e  $B_{max}$  foram gerados pelo programa Kell for Windows<sup>TM</sup> através do sub-diretório LIGAND / Saturação Fria (MUNSON & RODBARD, 1980; McPHERSON, 1985).

A interação entre o hormônio e o receptor forma um complexo que é reversível e representado pela seguinte reação:



onde  $K_1$  e  $K_2$  são as constantes de velocidade de associação e dissociação, respectivamente. Quando o sistema atinge o equilíbrio, para cada complexo HR formado, um outro complexo HR dissocia-se em H e R. A velocidade da reação é a mesma nos dois sentidos e a constante de associação ( $K_a$ ), pode ser calculada como:

$$K_a = \frac{[HR]}{[H] \cdot [R]}$$

onde  $[HR]$  é a concentração do complexo hormônio-receptor,  $[H]$  é a concentração do hormônio livre e  $[R]$  é a concentração de receptores não ocupados. Quando metade dos receptores estiverem ligados ao hormônio,  $[R]$  será igual a  $[HR]$ . A constante de associação que corresponde ao  $K_a$  e seu inverso  $K_d$  a constante de dissociação.

Desta forma, a concentração de hormônio livre necessária para saturar metade dos receptores será igual ao  $K_d$ . Desta forma os valores de  $K_d$  foram utilizados como um índice de afinidade dos receptores, sendo que pode-se estabelecer que quanto menor o  $K_d$ , maior a afinidade do hormônio por seu receptor e menor a tendência de dissociação do complexo HR (SANVITTO, 1992).

### **Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu, Tyr 4:1)**

Para cada amostra de membrana foram utilizados 2 animais de cada grupo, utilizando-se pelo menos 6 animais por grupo. As membranas preparadas como descrito anteriormente (40  $\mu$ g de proteína) foram incubadas por 30 minutos a 25°C em tampão Hepes (25 mM, pH 7,4) com 100 nM de albumina bovina, na presença de ortovanadato de sódio (1 mM), cloreto de manganês (10 mM) e cloreto de magnésio (10 mM); em um volume final de 45  $\mu$ L. Em seguida, foi adicionado a esta solução [ $\gamma^{32}$ P] ATP a 0,5  $\mu$ Ci (Amersham Biosciences – 3000 Ci/mmol) juntamente com ATP não marcado (5  $\mu$ M), mantendo-se a incubação a 25°C por mais 10 minutos. Após, foi adicionado 1 mM do substrato sintético poly (Glu, Tyr) 4:1 e as amostras incubadas por 1 h a 25°C. A reação foi interrompida pipetando-se a amostra em papéis de fosfocelulose – Gibco BRL (ORCY *et al.*, 2005). Seguiu-se uma lavagem com TCA a 10% e três lavagens com ácido fosfórico (75 mM). Os papéis secos foram colocados em líquido de cintilação [tolueno – triton X-100 (2:1), PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] e a incorporação do [ $\gamma^{32}$ P] ATP ao substrato exógeno foi medida em um contador beta LKB.

## **Análise Estatística**

Os resultados dos experimentos realizados foram expressos em média ( $\pm$ ) desvio padrão da média ou mediana e amplitude interquartil conforme distribuição dos resultados (WAGNER, 1998). Para fins de interpretação, as análises foram realizadas comparando-se o grupo ciclo estral entre si (anestro - controle, estro e diestro); e o grupo HEC-P entre si; utilizando o grupo diestro como controle, uma vez que o complexo HEC-P é uma moléstia característica do diestro. Para os dados obtidos, quando comparando-se duas médias, foi aplicado o teste *t* de Student (uma vez que algumas determinações não foram realizadas nas pacientes com HEC somente), e quando comparadas três médias foi utilizada análise de variância de uma via (ANOVA *One Way*), seguido do teste de Tukey. Quando necessário, conforme distribuição, normalidade e variância dos dados foram aplicados respectivamente os testes de Mann-Whitney, e Kruskal-Wallis em substituição ao teste *t* de Student e ANOVA *One Way*. Também realizou-se análise de correlação de Pearson entre algumas dos índices de sensibilidade à insulina quando pertinente. Para estas análises foi utilizado o programa, *Sigma Stat 2.0* para Windows; considerando-se significativa uma diferença entre médias com  $p < 0,05$ . Para análise estatística dos valores de glicemia e insulinemia durante o *IVGTT* foi aplicada uma análise de variância para medidas repetidas com o fator grupo e o fator de repetição tempo. Para estas análises foi utilizado o programa SAS (*Statistical Analysis System*) versão 9.1. considerando-se significativa uma diferença entre médias com  $p < 0,05$ .

## Medidas de Associação

Para complementação dos resultados obtidos foram calculadas medidas de associação para alterações nos índices de sensibilidade à insulina frente aos diferentes fatores de exposição. Para análise do grupo ciclo estral, foi adotada a razão de prevalência (RP), com respectivos intervalos de confiança 95%. Para cálculo da RP foi adotada a seguinte fórmula:

$RP = (\text{eventos}/n \text{ do grupo exposto}) / (\text{eventos}/n \text{ do grupo não exposto})$ . O intervalo de confiança foi calculado com a fórmula  $IC_{RP} = \exp[\ln(RP) \pm Z_{\alpha} \cdot EP_{\ln(RP)}]$ ; onde  $EP_{\ln(RP)}$  = raiz quadrada de  $(1/a - 1/a+b) + (1/c - 1/c+d)$  (WAGNER & CALLEGARI-JAQUES, 1998).

Na análise dos dados do grupo HEC-P, foram calculadas as razões de chance (*odds ratio*) para valores alterados em cada um dos testes de sensibilidade à insulina calculados a partir do IVGTT; utilizando-se a fórmula:  $OR = (\text{eventos}/\text{não eventos}) \text{ na população exposta} / (\text{eventos}/\text{não eventos}) \text{ na população não exposta}$ . O cálculo dos intervalos de confiança 95% (IC 95%) foi feita segundo a fórmula:  $IC \ 95\% \ OR = \exp[\ln(OR) \pm Z_{\alpha} \cdot EP_{\ln(OR)}]$ , onde  $EP_{\ln(OR)}$  = raiz quadrada de  $(1/a + 1/b + 1/c + 1/d)$ . O OR médio foi calculado a partir da média aritmética dos OR dos índices calculados. Os IC 95% e IC 99% para o OR médio foram calculados segundo a fórmula  $IC(\mu) = \chi \pm t_{\alpha, gl} \cdot EP$ ; onde  $EP = DP/\text{raiz quadrada do } n$  (WAGNER & CALLEGARI-JAQUES, 1998).

## CAPÍTULO I

### Influência do Ciclo Estral sobre a Sensibilidade à Insulina

#### RESULTADOS

##### Animais

Após a análise dos critérios de inclusão e resultados de citologia vaginal, histopatologia uterina e hemograma, 32 cadelas compuseram o grupo ciclo estral, sendo 11 cadelas em anestro (6 SRD, 1 Boxer, 1 Pastor Alemão, 1 Pitt-Bull, 1 Beagle e 1 Cocker), 7 cadelas em estro (6 SRD e 1 Cocker) e 14 cadelas em diestro (6 SRD, 2 Cockers, 1 Boxer, 1 Akita, 1 Rottweiler, 1 Fox e 1 Pitt-Bull). Para fins de classificação as cadelas em pró-estro e estro foram avaliadas dentro do mesmo grupo por tratar-se de uma fase de predomínio do estrógeno. A tabela 1 apresenta as médias, desvio padrão e intervalo da idade, peso e escore corporal das cadelas de cada grupo estudado. A análise de variância aplicada à idade ( $P = 0,081$ ) e ao peso ( $p = 0,860$ ) não apresentou diferenças significativas. Contudo; com relação ao escore corporal [(escala de 1 a 5; sendo 3 considerado ideal; adaptado de Laflamme (1997)] observou-se diferença significativa, porém sem relevância biológica, entre o grupo diestro e o grupo anestro ( $p = 0,025$ ). Foi utilizado teste de Kruskal-Wallis para idade, e teste de ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey para peso e escore corporal.

**Tabela 1.** Média, desvio padrão da média e intervalo de idade, peso e escore corporal de cadelas nas diferentes fases do ciclo estral.

	<b>Idade (anos)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Escore Corporal</b>
<b>Anestro (n = 11)</b>	1,32 ± 0,6 (0,5 – 2)	14,9 ± 6,19 (7,5 – 29)	2,81 ± 0,32 (2,5 – 3,5)
<b>Estro (n = 7)</b>	2,34 ± 1,26 (0,9 – 2,5)	15,7 ± 7,36 (6 – 29)	3,14 ± 0,24 (3 – 3,5)
<b>Diestro (n = 14)</b>	3,65 ± 3,25 (0,7 – 10)	16,6 ± 8,5 (6,1 – 26,6)	3,15 ± 0,31 (3 – 3,5)*

\* indica diferença significativa com relação ao grupo controle (anestro),  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey).

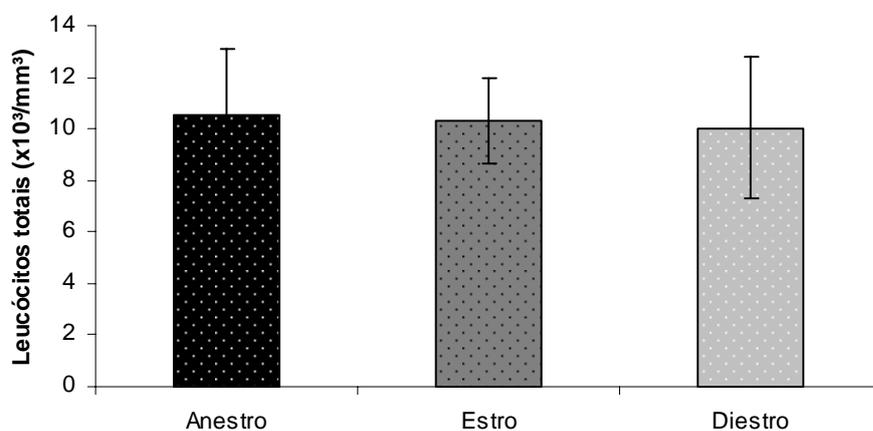
### Determinações Hematológicas

A **tabela 2** apresenta os valores do eritrograma dos grupos de cadelas em anestro, estro e diestro, não foram constatadas variações significativas dos valores de hemoglobina, eritrócitos e hematócrito entre os diferentes grupos experimentais.

A **Figura 6** representa os resultados dos leucócitos totais nas cadelas estudadas, não sendo verificadas diferenças significativas dos parâmetros estudados entre os grupos experimentais.

**Tabela 2.** Média, desvio padrão e intervalo dos parâmetros hematológicos (eritrócitos, hematócrito e hemoglobina) das pacientes avaliadas dentro do grupo ciclo estral.

	<b>Eritrócitos (<math>10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	<b>Hematócrito (%)</b>	<b>Hemoglobina (g/dL)</b>
<b>Anestro</b>	6,83 ± 0,95 (5,5 – 7,16)	42,2 ± 5,51 (34 – 50)	14 ± 1,56 (11,7 – 17,5)
<b>Estro</b>	7,28 ± 0,74 (6,24 – 8,4)	50,7 ± 3,68 (46 – 57)	17,1 ± 1 (16,1 – 18,4)
<b>Diestro</b>	7,06 ± 1,13 (5,42 – 7,9)	49,1 ± 8,5 (40 – 60)	16,7 ± 2,6 (13,9 – 21,6)



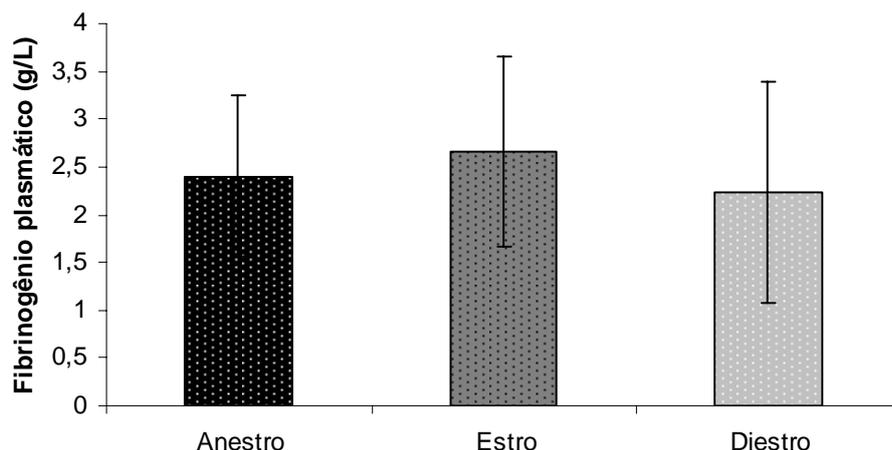
**Figura 6.** Valores médios de leucócitos totais observados na população estudada. Não foram detectadas diferenças significativas pela análise variância de uma via ( $p > 0,05$ ).

### Determinações Bioquímicas

A **figura 7** representa os valores de fibrinogênio plasmático nas cadelas estudadas, não sendo verificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

A **tabela 3** representa os resultados obtidos para ambos parâmetros de lipemia; representados em média  $\pm$  desvio padrão da média. A análise de variância dos valores de triglicerídeos ( $p = 0,185$ ) e colesterol sérico ( $p = 0,091$ ) não apresentou diferença significativa entre os grupos de estudo avaliados.

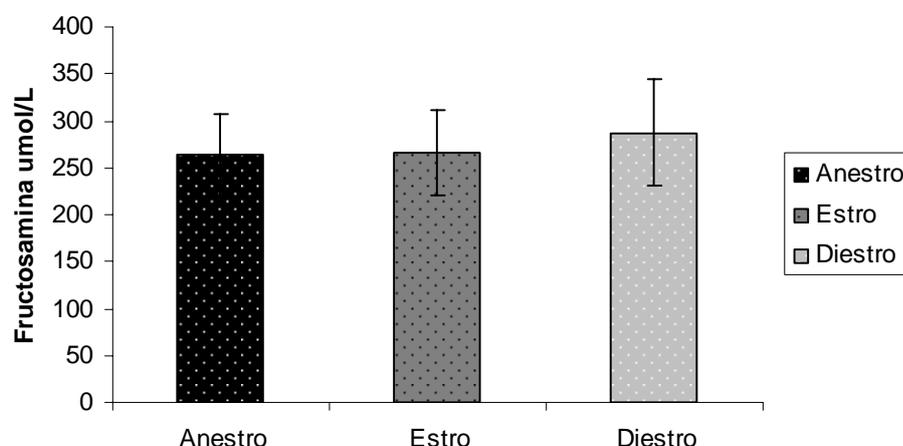
A **figura 8** apresenta os resultados de fructosaminemia obtidos representados em média  $\pm$  desvio padrão da média. Na determinação da fructosamina sérica não foi verificada diferença significativa ( $p = 0,520$ ) entre as cadelas em anestro, estro e diestro.



**Figura 7.** Valores de fibrinogênio plasmático em cadelas em diferentes fases do ciclo estral. Não foi constatada diferença significativa na análise variância de uma via ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.** Média, desvio padrão da média e intervalo dos parâmetros de lipemia avaliados (triglicerídeos e colesterol séricos) em cadelas em diferentes fases do ciclo estral. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) pela análise de variância de uma via.

	Triglicerídeos (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
<b>Anestro</b>	63 $\pm$ 22,4 (40,6 – 100,8)	142,6 $\pm$ 26,1 (111,2 – 183,8)
<b>Estro</b>	76,4 $\pm$ 29,4 (32 – 108,2)	128,2 $\pm$ 26,8 (88,7 – 175,06)
<b>Diestro</b>	82,2 $\pm$ 38,7 (42,2 – 179,68)	156,45 $\pm$ 47,3 (79 – 236)



**Figura 8.** Concentração (média  $\pm$  desvio padrão da média) de fructosamina sérica nos diferentes grupos experimentais. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ).

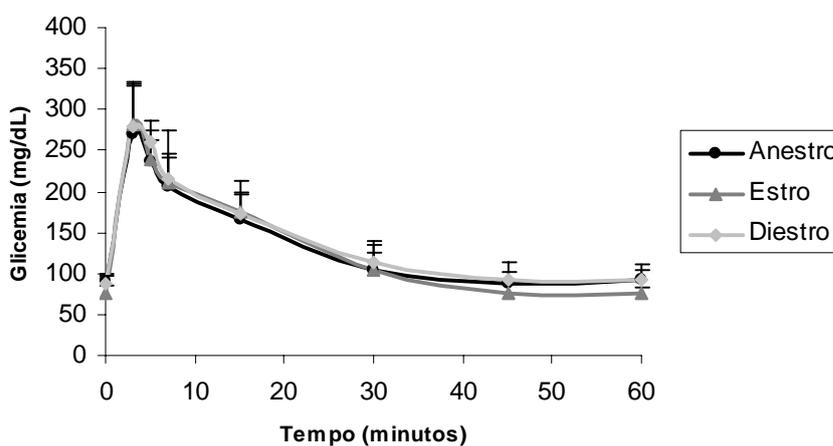
#### Teste de Tolerância à Glicose Intra-Venosa (IVGTT)

A avaliação da glicemia e insulinemia em conjunto é uma importante ferramenta para investigação da sensibilidade à insulina (AHREN & PACINI, 2004). Na **Figura 9** estão representados os valores de glicose plasmática basal e durante o IVGTT em cadelas em anestro, estro e diestro. Não foram verificadas diferenças significativas dos valores de glicose plasmática basais entre os três grupos experimentais estudados. O padrão temporal de resposta glicêmica à sobrecarga de glicose não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos anestro, estro e diestro.

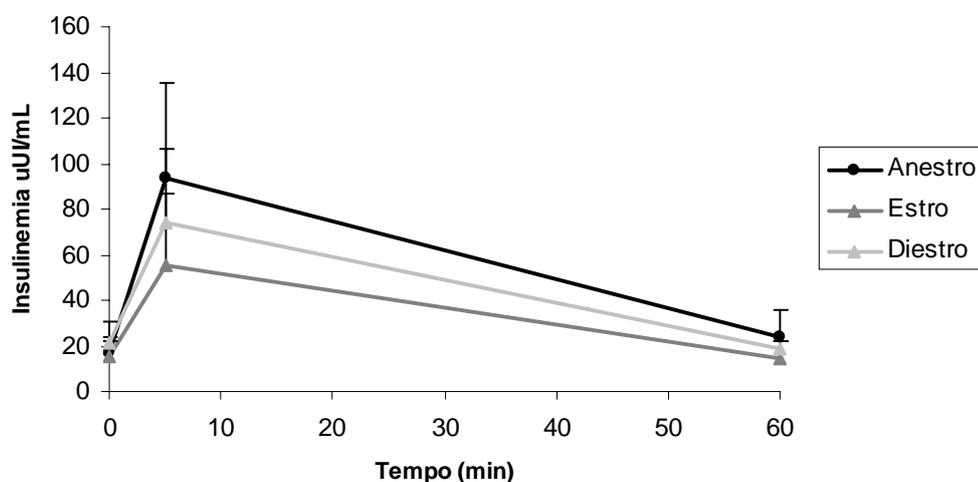
Os valores de insulina plasmática, antes e após (5 e 60 minutos) do *IVGTT*, nos três grupos experimentais estudados, estão representados na **Figura 10**. Os valores de insulina no plasma aos 5 minutos após a administração da sobrecarga de glicose no estro e diestro foram

40% e 21% menores, respectivamente, que aqueles observados no anestro. Contudo, não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre estes resultados.

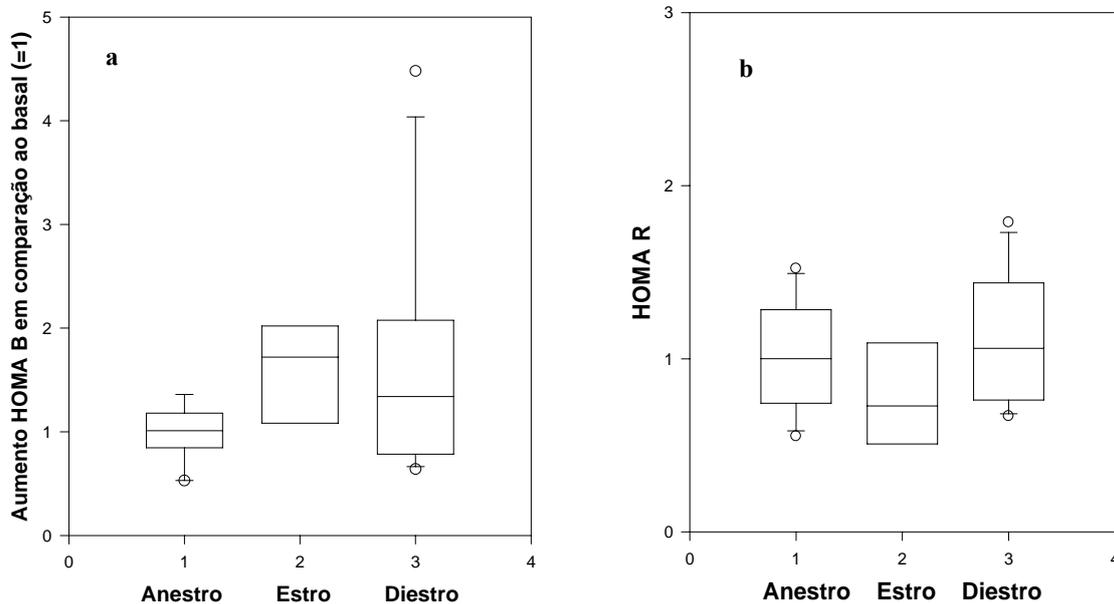
Com os resultados obtidos no IVGTT foram calculados os índices de atividade das células  $\beta$  (HOMA B) (Fig. 11a) e índice aproximado de resistência à insulina (HOMA R) (Fig. 11b); bem como a relação entre as respostas  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos do IVGTT (Fig. 12). Apesar do índice HOMA B ser maior nas cadelas em estro e em diestro, a diferença entre as medianas não obteve significância aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ). Da mesma forma as médias do HOMA R não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados pela análise de variância de uma via ( $p > 0,05$ ). Os valores da relação da resposta insulínica e glicêmica aos 5 minutos foram 41% e 40% menores nos grupos estro e diestro, respectivamente, do que aqueles verificados no anestro, entretanto, não foram significativamente diferentes.



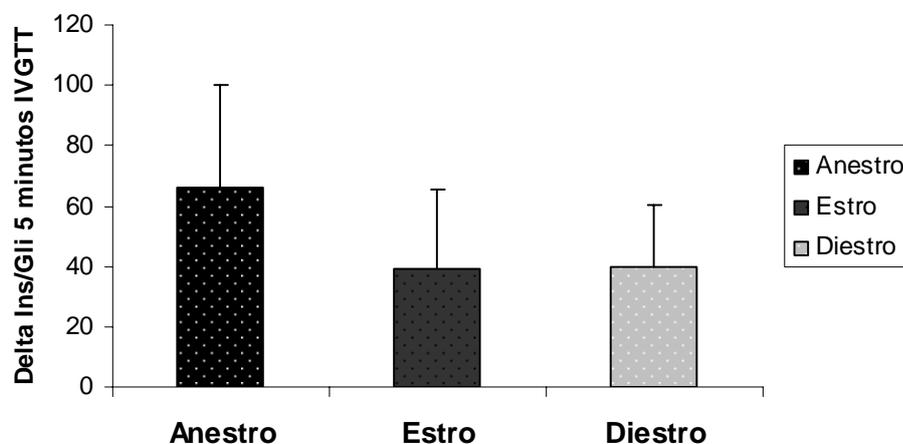
**Figura 9.** Concentração (média  $\pm$  desvio padrão da média) de glicose no plasma de cadelas dos grupos anestro, estro e diestro ao longo do IVGTT.  $n = 7 - 14$  animais.



**Figura 10.** Concentração (média  $\pm$  desvio padrão da média) de insulina plasmática nos grupos anestro, estro e diestro ao longo do IVGTT. n = 3 - 7 animais.



**Figura 11 a.** Medianas, intervalos interquartis e percentis 10 e 90% do aumento no índice HOMA B em relação ao basal (grupo anestro = 1). Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p = 0,530$ ) n = 3 - 7 animais. **Figura 11 b.** Medianas, intervalos interquartis e percentis 10 e 90% do índice HOMA R. Não foi detectada diferença significativa na análise variância de uma via ( $p = 0,511$ ). n = 3 - 7 animais.



**Figura 12.** Relação (média  $\pm$  desvio padrão da média)  $\Delta$ Ins/ $\Delta$ Gli aos 5 minutos de IVGTT. Não foram observadas diferenças significativas pela ANOVA de uma via ( $p = 0,224$ ).  $n = 3 - 7$  animais.

Ainda com base nas concentrações de glicose e de insulina no tempo zero do IVGTT (jejum), foram calculados os índices insulínogênicos e a relação insulina/glicose corrigida. Segundo Kogika *et al.* (2001) considera-se o paciente com hiperinsulinemia relativa, quando o índice insulínogênico ultrapassar o valor de 0,235 e a relação insulina/glicose corrigida passar de 30. A **tabela 4** apresenta as médias, desvio padrão e intervalo dos índices calculados. Apesar do índice insulínogênico no grupo diestro apresentar valores cerca de 25% maiores que aqueles constatados nos outros dois grupos experimentais e a relação insulina/glicose corrigida valores 24% e 30% maiores que aqueles verificados no estro e anestro, respectivamente, não houve diferença significativa. No entanto, a média do grupo diestro para ambos índices encontra-se na faixa considerada de resistência a insulina (0,250 e 39,1 respectivamente).

**Tabela 4.** Médias, desvio padrão e intervalo do índice insulinogênico e da relação insulina/glicose corrigida.

	<b>Índice Insulinogênico*</b>	<b>Relação Ins / Gli Corrigida**</b>
<b>Anestro</b>	0,186 ± 0,06 (0,127 – 0,262)	27,8 ± 9,26 (21,8 – 39,2)
<b>Estro</b>	0,187 ± 0,07 (0,140 – 0,271)	29,9 ± 10,64 (23,15 – 42,2)
<b>Diestro</b>	0,250 ± 0,12 (0,131 – 0,418)	39,1 ± 22,04 (19,37 – 80,8)

\* valor de referência: aumentado > 0,235

\*\* valor de referência: aumentado > 30.

Para os índices  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT, índice insulinogênico e relação insulina/glicose corrigida foi calculada a razão de prevalência (RP) de valores alterados (desfecho) a partir dos valores de referência citados nos trabalhos originais < 54, > 0,235 e > 30, respectivamente. Para isto foram comparados os grupos estro e diestro (grupos expostos) ao grupo controle anestro (não exposto). Para os índices HOMA B e HOMA R não foi calculada esta medida de associação em decorrência da ausência de valores de referência para a espécie estudada.

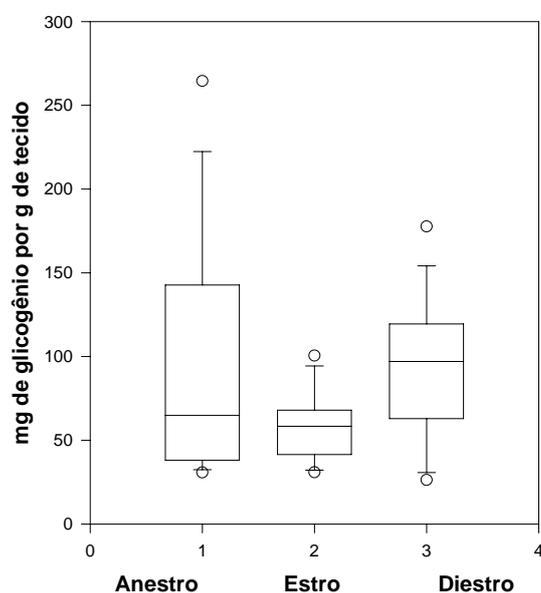
A **tabela 5** traz os resultados das razões de prevalência para a alteração destes índices com os respectivos intervalos de confiança 95%.

**Tabela 5.** Razão de prevalência e intervalo de confiança 95% para alteração nos índices  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT, índice insulinogênico e relação insulina/glicose corrigida.

	<b>Estro – RP (IC 95%)</b>	<b>Diestro – RP (IC 95%)</b>
<b><math>\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}</math> aos 5 minutos de IVGTT</b>	1,66 (0,43 – 6,23)	2,14 (0,71 – 6,35)
<b>Índice insulinogênico</b>	0,83 (0,12 – 5,52)	1,05 (0,07-15,33)
<b>Relação insulina/glicose corrigida</b>	0,83 (0,12 – 5,52)	1,42 (0,4 – 4,95)

## Determinação do Glicogênio Muscular

A **Figura 13** mostra os valores de glicogênio muscular após o IVGTT nos grupos experimentais estudados. Não foram verificadas diferenças significativas nos valores de glicogênio muscular entre os grupos anestro, estro e diestro.



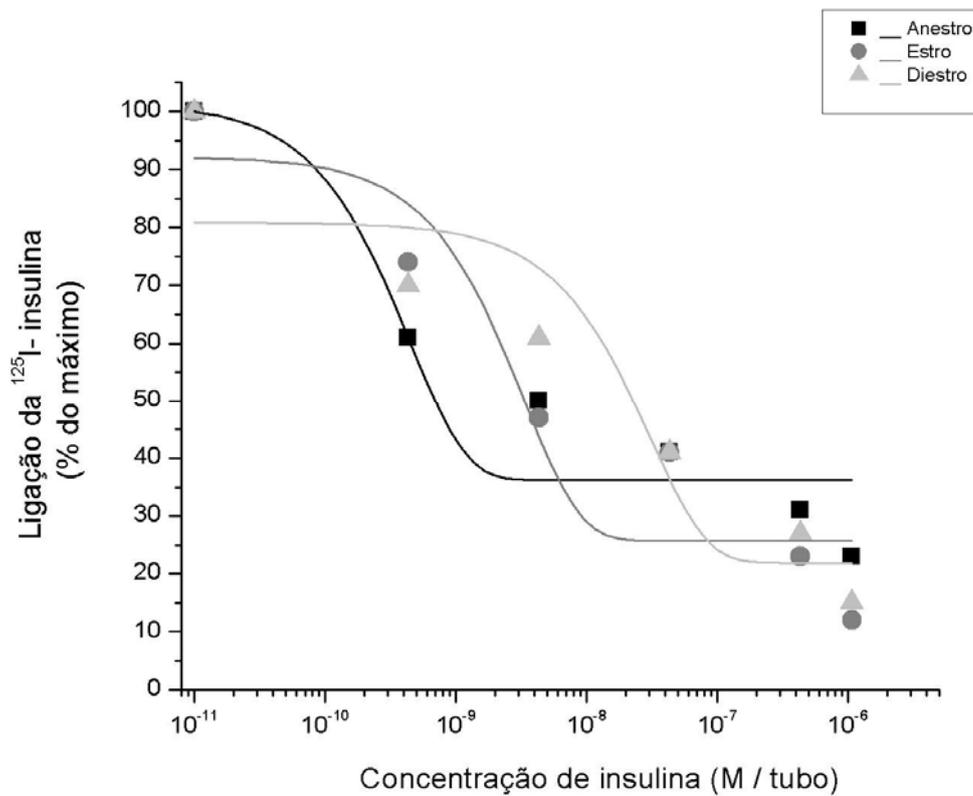
**Figura 13.** Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do glicogênio muscular das pacientes nos referidos grupos. Não foi observada diferença significativa pela ANOVA de uma via ( $p = 0,290$ ).

## Ensaio de Ligação da $^{125}\text{I}$ -Insulina em Presença de Diferentes Concentrações de Insulina Humana

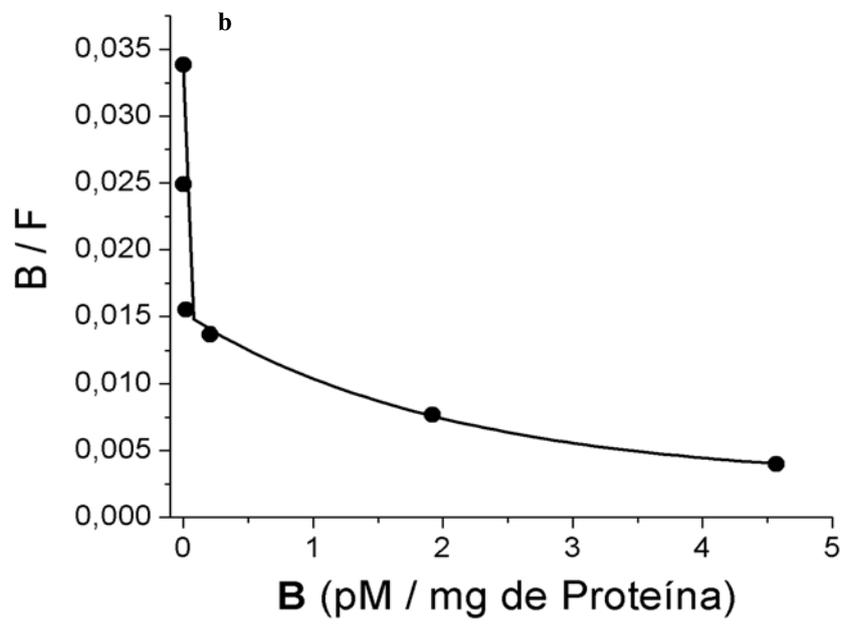
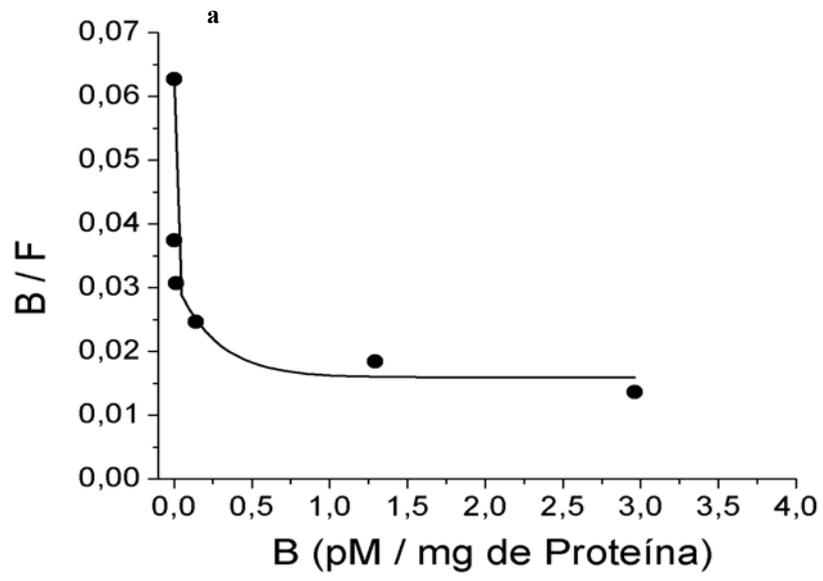
A **figura 14** apresenta as curvas de inibição competitiva da ligação de  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas de músculo esquelético, pelo aumento da concentração de insulina humana não marcada. Os ensaios de ligação da  $^{125}\text{I}$ -Insulina ao receptor, em presença de concentrações crescentes de insulina não marcada, mostraram que no músculo reto-abdominal de cadelas ocorreram sítios de ligação à insulina de alta e de baixa afinidade. As **figuras 15 a, b e c** apresentam as curvas de Scatchard dos resultados do estudo de ligação insulina-receptor das pacientes ao longo do ciclo estral. A relação da insulina ligada/livre (*Bound/Free* – B/F) foi representada graficamente contra a quantidade de insulina ligada (*Bound* – B) por pM de proteína. A constante de dissociação dos sítios (Kds) de alta e de baixa afinidade serão referidas como Kd 1 e Kd 2, respectivamente. A capacidade máxima de ligação destes sítios também foi determinada sendo aqui referida como Bmax 1 e Bmax 2. Os valores de Kd e Bmax para os sítios de alta afinidade foram expressos em fM/mg de proteína, enquanto que para os sítios de baixa afinidade; os valores de Kd e Bmax foram expressos em pM/mg de proteína.

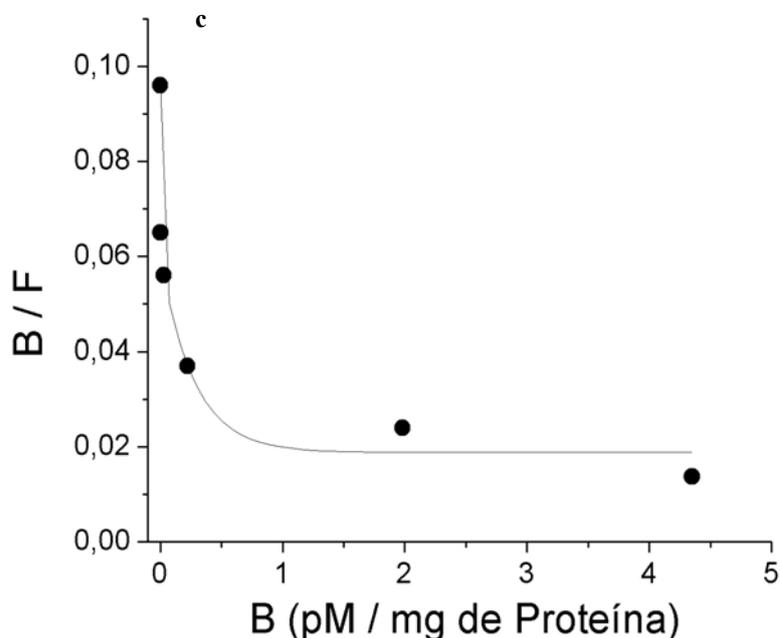
A **tabela 6** representa os valores de Kd e de Bmax, para cada um dos sítios de ligação à insulina, em tecido muscular de cadelas nas diferentes fases do ciclo estral. As cadelas em anestro apresentaram os menores valores de Kd 1 e Bmax 1 em comparação aos grupos estro e diestro ( $p < 0,001$ ). O grupo estro apresentou os maiores valores de Kd 1, sendo significativa ( $p < 0,001$ ) a diferença em relação aos grupos anestro e diestro. Com relação aos valores de Kd e Bmax dos sítios de baixa afinidade; não foram observadas diferenças significativas entre os

grupos experimentais estudados ( $p = 0,730$  para  $Kd\ 2$  e  $p = 0,05$  para  $Bmax\ 2$ ). Os menores valores de  $Kd\ 2$  foram observados no grupo diestro e os menores valores de  $Bmax\ 2$  foram verificados no grupo estro. Todos os parâmetros foram analisados através de ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.



**Figura 14** - Inibição competitiva da ligação de  $^{125}I$ -insulina em membranas de músculo esquelético, pelo aumento da concentração de insulina humana não marcada. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata.





**Figura 15 a, b e c** - Curvas de Scatchard em preparações de membrana de tecido muscular esquelético de fêmeas caninas em diferentes fases do ciclo estral. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata. Curvas representativas dos grupos anestro (a), estro (b) e diestro (c).

**Tabela 6.** Valores de Kd (constante de dissociação) dos sítios de ligação à insulina de alta (Kd 1) e de baixa (Kd 2) afinidade e a capacidade de ligação máxima destes sítios (Bmax 1 e Bmax 2) em músculo de cadelas em diferentes fases do ciclo estral.

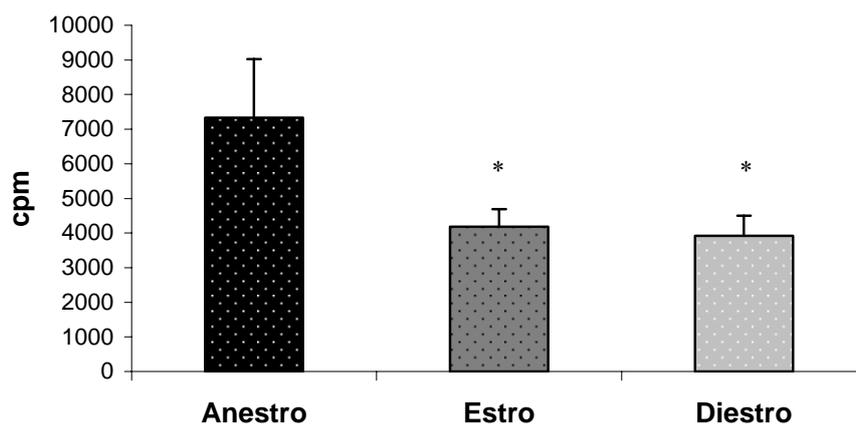
	<b>Kd 1</b> (fM/mg ptn)	<b>Bmax 1</b> (fM/mg ptn)	<b>Kd 2</b> (pM/mg ptn)	<b>Bmax 2</b> (pM/mg ptn)
<b>Anestro</b>	6,54 ± 2,77 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,061 <sup>a</sup>	26,06 ± 22,29 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,52 <sup>a</sup>
<b>Estro</b>	28,54 ± 6,94 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,42 <sup>b</sup>	25,68 ± 12,79 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>Diestro</b>	15,56 ± 3,88 <sup>c</sup>	1,24 ± 0,24 <sup>b</sup>	18,56 ± 7,36 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,37 <sup>a</sup>

Média ± desvio padrão da média

Letras diferentes (<sup>a,b,c</sup>) representam diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey.

### Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu,Tyr 4:1)

Na **figura 16** estão representados os resultados de fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr 4:1) nas preparações de membrana de tecido muscular esquelético das pacientes nas diferentes fases do ciclo estral. Os resultados mostraram uma fosforilação basal nas pacientes em anestro 42% e 46% superior àquelas observadas nas pacientes em estro ou diestro, respectivamente ( $p < 0,001$ ).



**Figura 16.** Valores médios e desvio padrão da média dos valores de fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr 4:1) em presença de albumina em preparações de membrana de tecido muscular esquelético de pacientes em anestro, estro ou diestro. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação a fosforilação basal do grupo anestro.

## DISCUSSÃO

A determinação do escore corporal, conforme critérios definidos por Laflame (1997) e adaptado neste trabalho a uma escala de 1 a 5; sendo 1 = caquético, 2 = magro, 3 = ideal, 4 = sobrepeso e 5 = obeso; foi importante para a determinação de grupos de cadelas homogêneos com relação à condição corporal, evitando assim possíveis diferenças na sensibilidade à insulina em decorrência de sobrepeso ou caquexia. Mesmo tendo-se observado diferença significativa entre a condição corporal do grupo anestro e dos demais grupos, as flutuações estão ao redor do escore 3 (ideal). As idades também apresentaram homogeneidade, afastando a possibilidade de alterações na sensibilidade à insulina em decorrência de diferenças marcantes na idade; uma vez que há tendência de menor sensibilidade à insulina em animais idosos (FELDMAN & NELSON, 2004). Também as diferenças em relação a medida de porte do animal foram minimizadas, pois todas as pacientes eram eutróficas. Com relação às raças presentes no grupo ciclo estral; somente o fox (uma ocorrência no grupo diestro) consta em listas de raças com maior predisposição ao desenvolvimento de diabetes (*odds ratio* 3,02 IC 95% 1,94 – 4,7); as demais raças das pacientes que participaram do estudo, na verdade apresentam-se com menor risco de desenvolvimento de diabetes (*odds ratio* entre 0 e 1), utilizando-se os cães SRD como referência (*odds ratio* 1) (HESS *et al.*, 2000; GUPTILL *et al.*, 2003; CATCHPOLE *et al.*, 2005).

As determinações hematológicas evidenciaram o adequado estado de saúde das pacientes participantes no estudo, evitando assim inclusão de pacientes com mordidades passíveis de alterar os testes de sensibilidade à insulina (RAND *et al.*, 2004; FELDMAN &

NELSON, 2004). Alterações na sensibilidade à insulina podem se manifestar por meio de alterações nos indicadores de lipemia dos pacientes (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005). No presente estudo não foram observadas diferenças significativas nos valores de triglicerídeos e de colesterol nos diferentes grupos. Estes resultados estão de acordo com achados de Renauld *et al.* (1998) que também observaram que as diferentes fases do ciclo estral não alteram significativamente os valores de triglicerídeos, lipídeos e colesterol basais, assim como de ácidos graxos livres e glicerol (RENAULD *et al.*, 1999). Contudo, em pacientes naturalmente diabéticas não castradas, durante as fases estrogênicas e lútea do ciclo estral, observam-se concentrações maiores de lipídeos quando comparadas aquelas verificadas em pacientes diabéticas em anestro. Em testes de tolerância à insulina em pacientes diabéticas (ITT – *insulin tolerance test*) a resposta dos triglicerídeos à insulina das pacientes em anestro foi superior a de pacientes em diestro ao fim do teste. Já o contrário foi observado em pacientes não diabéticas (RENAULD *et al.*, 1998).

A fructosamina é considerada uma das principais ferramentas no controle a longo prazo da glicemia de pacientes diabéticos, também apresentando um importante valor para diferenciar de animais estressados (JENSEN 1995; BEHREND 2001; GRECO 2001b; LOSTE & MARCA 2001; SCHULMAN 2003). A fructosamina é sintetizada quando uma molécula de glicose em sua forma aberta (cerca de 0,001% da glicose circulante) combina-se de forma não enzimática e reversível a um grupamento amino, normalmente resíduos de lisina nas proteínas. Este composto (aldimina – base de Schiff) vai transformando-se lenta e irreversivelmente por meio do rearranjo de Amadori em um estável composto cetoamina (JENSEN, 1995). Este processo ocorre em praticamente todas proteínas corpóreas, como as proteínas plasmáticas,

colágeno e elastinas. A concentração de fructosamina é uma mensuração de todas as proteínas glicosiladas séricas, no entanto a albumina é a principal proteína sérica, e é muito mais sensível a glicosilação (JENSEN, 1995). Desta forma como a meia vida da fructosamina é de cerca de 2 semanas, a concentração de fructosamina oferece um indicador da glicemia nas últimas duas semanas (KANEKO *et al.*, 1997). A mensuração sérica de fructosamina nas pacientes estudadas não evidenciou diferenças significativas que pudessem indicar ou suportar alterações no estado glicêmico das pacientes.

A resposta glicêmica ao IVGTT, das pacientes estudadas nos diferentes grupos, não apresentou diferenças significativas, bem como a glicemia de jejum. A ocorrência de resistência à insulina e intolerância à glicose associada à fase do diestro é frequentemente comparada ao diabetes mellitus gestacional humano (DMG). O DMG é caracterizado como uma intolerância aos carboidratos identificada pela primeira vez durante a gestação (RUSSELL *et al.*, 2007). Divergências existem em diferentes países para critérios de diagnóstico de DMG e pontos de corte para o diagnóstico, contudo, uma resposta glicêmica superior a 140 mg/dL após 1 hora de uma dose oral de 50 g de glicose (OGTT – *oral glucose tolerance test*) em mulheres entre a 26<sup>a</sup>-28<sup>a</sup> semana de gestação é considerado preditivo de DMG (PHILLIPS, 2006). Para confirmação do diagnóstico; é necessário uma glicemia de jejum maior que 100 mg/dL após uma dieta rica em carboidratos por 3 dias ou uma glicemia superior a 144 mg/dL após 2 horas de uma dose oral de 75 g de glicose (PHILLIPS, 2006). Russell *et al.* (2007) consideram para fins de diagnóstico uma resposta glicêmica  $\geq 135$  mg/dL no segundo trimestre de gestação ou  $\geq 173$  mg/dL no terceiro semestre após 2 horas durante um OGTT de 75 g de glicose.

A prevalência de DMG pode variar de 1 a 14% conforme a população estudada (NILSSON *et al.*, 2007) e muito da semelhança entre o DMG e a DM canina reside no fato de que mulheres com DMG podem retomar aos valores glicêmicos normais após o parto em até 90% dos casos (KIM *et al.*, 2007). Contudo, a ocorrência de DMG em humanos em uma gestação aumenta em até 62% a incidência de diabetes durante a vida da paciente (NILSSON *et al.*, 2007). De fato, na população canina, cerca de 5% das pacientes identificadas com diabetes durante o diestro, podem reverter a necessidade de insulina se castradas imediatamente após o diagnóstico. As cadelas que sofreram diabetes reversível durante o diestro e não foram castradas apresentam grandes chances de tornarem-se diabéticas na próxima fase lútea do ciclo, independente da presença ou não de gestação (RAND *et al.*, 2004; FELDMAN & NELSON, 2004).

No entanto, a ocorrência de DMG humana, e o desenvolvimento posterior de DM tipo I ou tipo II após a gestação, estão associados a uma série de fatores de risco genéticos, auto-imunes e ambientais (CHU *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; NILSSON *et al.*, 2007; WATANAKE *et al.*, 2007). Na literatura, observa-se uma ampla variação no índice de recorrência de DMG em mulheres, bem como na incidência e severidade da doença, conforme raça/etnia (BEISCHER *et al.*, 1991; KIM *et al.*, 2007). Nilsson *et al.* (2007) demonstraram a presença de auto-anticorpos contra GAD, células das ilhotas (ICA – *islet cell antibody*) e contra a enzima tirosina fosfatase (IA-2A) em 24 de 385 mulheres com DMG. Destas, 50% desenvolveram DM tipo I entre 6 meses e 10 anos após o parto, o que reforça a idéia de que a ocorrência de DMG pode desencadear o aparecimento de DM tipo I. Esta afirmativa baseia-se na constatação da presença de auto-anticorpos, que podem ser detectados anos antes do início dos sintomas. Assim, a

resistência à insulina durante a gestação levaria a um aumento na demanda das células  $\beta$  remanescentes e já afetadas pelo processo auto-imune. Desta forma a DMG pode na verdade mascarar um estágio inicial do DM tipo I ao ser interpretada somente como DMG (NILSSON *et al.*, 2007).

A mesma lógica poderia ser aplicada ao diabetes mellitus canino com início durante o diestro. Evidências acumuladas apontam para a presença de auto-anticorpos contra células  $\beta$  em cerca de 50% dos pacientes caninos com diagnóstico recente de DM (HOENIG, 2002). Entretanto, de cada 100 cães que recebem diagnóstico de DM, cerca de 70% são fêmeas (CATCHPOLE *et al.*, 2005), e destas fêmeas com diagnóstico recente de diabetes, aproximadamente 70% encontravam-se no diestro no começo da doença (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005). Não seria nenhuma surpresa a detecção de auto-anticorpos, evidenciando um diabetes auto-imune (insulite imunomediada), em uma proporção significativa de cadelas com diagnóstico de DM durante o diestro. Neste cenário o diestro poderia ser um fator agravador do processo auto-imune no diabetes. Como não foi realizada a dosagem de auto-anticorpos neste estudo; e a população estudada foi relativamente pequena, não foi possível verificar esta hipótese. A maior predisposição ao desenvolvimento de diabetes, encontrada em algumas raças, pode também influenciar na ocorrência de resistência à insulina durante o diestro.

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas na resposta glicêmica ao IVGTT entre os diferentes grupos do ciclo estral. Este fato pode ser explicado, em parte, pela utilização de animais de raças e origem diferentes que não apresentavam outros fatores predisponentes à intolerância à glicose, fora a fase lútea do ciclo, como por exemplo a

obesidade. Apesar disto; algumas evidências encontradas neste estudo apontam para uma menor sensibilidade à insulina nas pacientes em diestro; apesar de não terem atingido significância estatística.

A obesidade aparece como um dos principais fatores ambientais de risco à ocorrência de DMG e a grande maioria das pacientes com DMG, posteriormente tornam-se diabéticas do tipo II (CHU *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007). A meta-análise realizada por Chu *et al.* (2007) evidenciou *odds ratio* de 2,14 (IC 95% 1,82 - 2,53); 3,56 (IC 95% 3,05 – 4,21) e 8,56 (IC 95% 5,07 – 16,04) entre mulheres com sobrepeso, obesas ou severamente obesas, respectivamente, para o desenvolvimento de DMG. Segundo Rand *et al.*, (2004), o clássico trabalho de Mattheeuws *et al.*, (1984) associando a obesidade à intolerância à glicose não pode descartar a ocorrência conjunta de antagonismo promovido pela progesterona, uma vez que de 15 cadelas avaliadas, 13 não eram castradas.

Da mesma forma que diversos genes já foram descritos como possivelmente envolvidos na ocorrência de diferentes formas de diabetes, podendo inclusive, ser pesquisados com objetivo de identificação de pacientes em risco; alguns genes são candidatos ao envolvimento no início de ambas formas do DMG (auto-imune e não auto-imune) (WATANAKE *et al.*, 2007).

Diversos autores postularam que a ocorrência da resistência à insulina, intolerância à glicose e predisposição ao diabetes nas fêmeas caninas durante a fase do diestro pode depender não somente de altas concentrações de progesterona e de GH, características desta fase do ciclo

(EINEGENMANN *et al.*, 1983), mas sim depender de fatores genéticos, auto-imunes ou ambientais associados (FELDMAN & NELSON, 2004; RAND *et al.*, 2004; CATCHPOLE *et al.*, 2005) como observado no estudo de Pöppel & González (2005). Eingenmann *et al.* (1983) evidenciaram a ausência na supressão do GH frente à hiperglicemia em fêmeas em diestro ou tratadas com medroxiprogesterona. O presente trabalho evidenciou pela primeira vez, a influência do ciclo estral sobre as características da ligação da insulina ao IR, afinidade da ligação insulina-receptor, bem como nos passos iniciais da transdução do sinal insulínico no músculo de cadelas nas fases do ciclo estral. Esses achados levantam um novo foco de estudos na compreensão da resistência insulínica observada no diestro, e ajudam a refutar a idéia de que essa resistência à insulina deva-se somente a elevadas concentrações de GH frente a progesterona, uma vez que este achado é mais frequentemente observado em cadelas idosas (EINGENMANN *et al.*, 1983; SELMAN *et al.*, 1994; RIJINBERK *et al.*, 2003) e a população deste estudo era composta de cadelas jovens.

O índice HOMA (*homeostatic model assessment*) de percentual de atividade das células  $\beta$  (HOMA B) e de resistência à insulina (HOMA R) foi desenvolvido por Matthews *et al.* (1985). Este índice tem como objetivo de avaliar a sensibilidade à insulina e a atividade das células  $\beta$ , utilizando somente os valores de glicemia e de insulinemia em jejum. Neste estudo, a aplicação do índice HOMA foi adaptada, uma vez que foi desenvolvido para uso em humanos. Como o estudo original considerou que pacientes saudáveis com peso normal e menos de 35 anos apresentavam atividade das células  $\beta$  de 100% e resistência à insulina = 1; para fins de comparação, considerou-se, neste trabalho, que o grupo anestro (composto de cadelas com

menos de 2 anos, saudáveis e com escore corporal ideal) apresentava atividade de células  $\beta$  de 100% e resistência à insulina = 1.

O HOMA B mostrou-se levemente aumentado nas pacientes em estro ou em diestro quando comparado aos valores encontrados em cadelas em anestro; apesar de não ter atingido significância estatística. Como este índice é calculado a partir de valores obtidos em jejum, quando a liberação de insulina pelas células  $\beta$  é baixa, índice com valores mais altos indicariam que o mecanismo glicose-secreção de insulina pode estar acometido. Este resultado talvez indique que nestas fases do ciclo estral ocorra um “esforço” maior das células  $\beta$  para a manutenção de uma euglicemia em jejum.

No entanto, os valores de insulinemia observados durante o IVGTT revelam valores maiores de insulina no grupo anestro, em comparação aos demais grupos. Porém esta maior secreção de insulina no grupo anestro não foi significativa. Renault *et al.*, (1990) demonstraram que, a indução artificial de ciclo estral por meio da administração seqüencial de estrógenos e progesterona, promove um acúmulo pancreático de insulina, reduzindo a resposta insulínica após desafio com glicose, o que está de acordo com o observado neste estudo (menor secreção de insulina nas fases de estro e diestro quando comparadas ao grupo anestro, apesar da diferença não ter sido significativa).

Da mesma forma, o HOMA R não apresentou diferença estatística, apesar do maior valor no grupo diestro em comparação ao anestro. A falta de valores de referência para estes parâmetros em cães, bem como pontos de corte em testes provocativos prejudicam a avaliação

destes parâmetros e justificam este tipo de investigação. Oliveira *et al.* (2005) revisando a utilização clínica do índice HOMA na prática clínica reconhecem o prejuízo da falta de um valor de corte estabelecido para classificação dos resultados em pacientes humanos.

O  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT, foi adaptado de Omori *et al.* (1991). Originalmente o  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  foi aplicado ao OGTT e verificado o  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 30 minutos de teste, como método auxiliar no diagnóstico de pacientes com DMG. Pacientes humanas com valores de  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  inferiores a 54 são consideradas como fracamente responsivas (*low responders*) ao desafio com glicose; mesma resposta observada em pacientes humanos com diabetes. Pesquisas clínicas evidenciaram que eventualmente estas *low responders* irão desenvolver diabetes no futuro após término da gestação (OMORI *et al.*, 1991). Apesar da diferença não ter sido significativa com relação ao grupo anestro; as médias dos grupos estro e diestro encontram-se dentro da faixa considerada de risco (< 54). De acordo com estes achados, Renauld *et al.* (1990) evidenciaram menor resposta insulínica frente à glicose em decorrência de exposição aos estrógenos e à progesterona em cães.

O índice insulínico; proposto inicialmente como uma ferramenta ainda mais fácil de avaliação da sensibilidade à insulina, sem necessidade de uso de equações ou programas computacionais como exigido para cálculo do HOMA (GUTT *et al.*, 2000), e a relação glicose / insulina corrigida (KOGIKA *et al.*, 2001; FELDMAN & NELSON, 2004); apesar de mostrarem a média do grupo diestro na faixa de hiperinsulinemia relativa, em relação aos grupos anestro e estro, não houve significância estatística.

A avaliação da razão de prevalência para estes índices com os respectivos intervalos de confiança com 95% de confiança também falhou em mostrar associação significativa entre estas variáveis, uma vez que o intervalo de confiança passa pelo valor trivial 1 (WAGNER & CALLEGARI-JAQUES, 1998). No entanto, a partir dos valores dos intervalos de confiança pode-se tirar duas grandes conclusões: (1) o amplo intervalo reforça a necessidade de aumentar o número (n) amostral para que se possa identificar mais facilmente pacientes em maior risco de DM na população, (2) os valores relativamente altos dos limites superiores dos intervalos de confiança 95%; afastando-se do 1 de forma moderada a intensa, evidenciam que apesar de não significativa a associação entre a fase do ciclo estral e a resistência à insulina, a exposição (ocorrência de estro ou diestro) representam um importante fator de risco para população (WAGNER & CALLEGARI-JAQUES, 1998). Cianni *et al.* (2007) evidenciaram a presença de risco de morbidades associadas ao DMG mesmo em mulheres gestantes com somente um valor alterado durante um OGTT, mostrando que os efeitos metabólicos da DMG podem estar presentes mesmo quando os testes falham em demonstrar este quadro.

Scaramal *et al.*, (1997), estudando o impacto do ciclo estral sobre a sensibilidade à insulina, observaram resultados diferentes do presente estudo; talvez em parte por diferenças metodológicas, como por exemplo, o uso de uma dose de 1 g / kg de glicose para realização do IVGTT. Renauld & Garrido (1992) demonstraram em cães diferentes respostas de glicose e de insulina frente a diferentes doses de glicose para realização de IVGTT. No estudo de Scaramal *et al.* (1997) nos grupos estro e diestro os picos de glicose foram menores após infusão de glicose, ao passo que no grupo estro a resposta insulínica foi maior. Contudo nas pacientes nas fases de estro e diestro com diabetes, ocorre uma falha na resposta insulínica durante IVGTT em

decorrência de fatores pancreáticos (lesões histológicas às ilhotas de Langerhans) e extra-pancreáticos (hiperprodução basal de GH e falha na supressão da produção do GH frente a hiperglicemia) (EIGENMANN *et al.*, 1983; SCARAMAL *et al.*, 1997).

Os achados deste estudo, apesar de não significativos, concordam com Renauld *et al.* (1990) e Scaramal *et al.* (1997) na observação de valores menores de resposta insulínica durante o diestro e que este potencial diabetogênico, começa já durante o estro (EIGENMANN *et al.*, 1983; SCARAMAL *et al.*, 1997; SELMAN *et al.*, 1994; RIJNBERK *et al.*, 2003). Contudo, somente uma pequena minoria das cadelas não castradas desenvolvem diabetes (apesar da maioria das que desenvolvem estarem no diestro) (CATCHPOLE *et al.*, 2005; PÖPPL & GONZÁLES, 2005). A maior secreção de GH frente a concentrações normais de progesterona acontece somente em pacientes mais idosas, o que ajuda a explicar porque a apresentação típica de um canino diabético, costuma ser uma fêmea, não castrada, com idade normalmente superior a 7 anos e com início dos sintomas no diestro (FELDMAN & NELSON; PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005).

Assim, pode-se concluir que a fase do diestro, *per se*, não seria a responsável pela indução do diabetes (RENAULD *et al.*, 1990; SCARAMAL *et al.*, 1997). Da mesma forma, diversas evidências apontam que a ocorrência do DMG humano também depende de uma série de fatores genéticos e ambientais (COUSINS, 1991; CHU *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; WATANAKE *et al.*, 2007). Assim, a patogênese do diabetes iniciado durante o diestro seria mais complexa do que a simples superprodução de GH frente a progesterona como postulado por Eingenmann *et al.* (1983), e dependeria mais de diversos fatores ambientais, auto-imunes,

raciais e genéticos. Contudo, a ocorrência do diestro em pacientes que apresentam qualquer anormalidade pancreática que falhe em compensar a resistência à insulina característica desta fase, representa um fator de risco ao desenvolvimento de diabetes. Pacientes idosas, mais expostas temporalmente e periodicamente aos hormônios diabetogênicos; ou com qualquer predisposição genética à ocorrência de DM estariam ainda mais suscetíveis a desenvolver DM no diestro (SCARAMAL *et al.*, 1997; FELDMAN & NELSON, 2004).

A determinação da concentração muscular de glicogênio não mostrou diferenças metabólicas do tecido muscular em resposta à insulina durante o ciclo estral em cadelas. Uma vez que a síntese de glicogênio depende do estímulo insulínico (NEWSHOLME & DIMITRIADIS, 2001), um estado de resistência à insulina poderia provocar menor captação de glicose e síntese de glicogênio nas pacientes estudadas. Todos animais passaram por jejum de 8 a 12 horas para realização do IVGTT e OSH; sendo que a coleta dos tecidos foi realizada aproximadamente 2 horas após a infusão de glicose. Talvez, se no presente estudo a avaliação do glicogênio hepático tivesse sido realizada, uma vez que na situação de jejum pré-operatório, o fígado teria suas reservas de glicogênio significativamente reduzidas, e responderia prontamente ao estímulo insulínico após o IVGTT, com síntese de novo glicogênio, essa determinação auxiliaria na investigação dos efeitos celulares da insulina. Esta avaliação fica comprometida no tecido muscular em decorrência da sua característica de preservar seu glicogênio mais para atividade muscular, sofrendo pequena variação frente a um jejum curto como estabelecido no pré-operatório.

Desta forma, os estudos realizados *in vivo*, apesar de sugerirem a presença de alterações interessantes na sensibilidade insulínica e capacidade de resposta secretora pelas células  $\beta$  pancreáticas, não foram eficazes em comprovar estas alterações. Contudo, os estudos *in vitro* sobre as características do receptor insulínico e a ativação da via de sinalização intracelular da resposta insulínica no músculo, apresentaram resultados bem interessantes, evidenciando prejuízo na sensibilidade tecidual à insulina no estro e no diestro. Este achado é muito importante, pois não se conhece na literatura veterinária, o papel de alterações nas características dos receptores de insulina e dos passos pós-receptor de sinalização da insulina na etiopatogênese do diabetes mellitus canino.

Diferenças marcantes foram detectadas na sensibilidade tecidual à insulina no que diz respeito à capacidade de ligação máxima (Bmax) dos receptores insulínicos e na quantidade de hormônio necessária para dissociar 50% dos sítios de ligação (Kd). Estas diferenças ficam claras na análise da curva de inibição competitiva da ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina frente a concentrações crescentes de insulina não marcada, onde observa-se a necessidade de maiores concentrações de hormônio não marcado para inibir 50% da ligação total nos grupos estro e diestro. A análise dos resultados das curvas de saturação com hormônio não marcado pelo método de Scatchard (1959); utilizando o programa Kell for Windows (MUNSON & RODBARD, 2000; McPHERSON, 1985), evidenciou a presença de dois sítios de ligação à insulina no tecido muscular das pacientes; sendo uma população de receptores de alta afinidade / baixa capacidade (1) e outra de baixa afinidade / alta capacidade (2). A relação curvilínea observada nas diferentes fases do ciclo estral na representação gráfica da relação B/F (*Bound/Free*) contra a quantidade ligada de hormônio (B) por pM de proteína, confirma a presença destes sítios. Os

mesmos sítios de ligação foram demonstrados em músculo, coração e fígado de cães neonatos e adultos por Johnston *et al.* (1991). Estes autores evidenciaram nos sítios de alta afinidade uma maior capacidade de ligação hormonal no tecido muscular de cães neonatos em comparação aos adultos, porém sem diferenças de afinidade hormônio-receptor.

Neste trabalho foi observada uma maior capacidade de ligação dos sítios de alta afinidade ( $B_{max1}$ ) em pacientes durante o estro ou diestro, quando comparadas ao grupo anestro. Contudo, a maior capacidade de ligação foi acompanhada de uma maior constante de dissociação ( $K_{d1}$ ) nos grupos estro e diestro; o que representa uma menor capacidade de ligação / afinidade; uma vez que mais hormônio é necessário para que 50% dos receptores permaneçam ocupados (GRIFFIN & OJEDA, 2004). Desta forma, pode-se inferir, que durante o ciclo estral ocorrem alterações fisiológicas na afinidade de ligação entre a insulina e seus receptores de alta afinidade, e o maior número de sítios de ligação, com objetivo de manter a homeostase da resposta insulínica face às variações hormonais características do ciclo estral, parece compensar esta menor afinidade. Os testes de sensibilidade a insulina falharam em evidenciar a presença de um estado de resistência à insulina, confirmando que as alterações das características da ligação insulina-receptor mantêm a resposta fisiológica da insulina no tecido muscular de cadelas durante as fases do ciclo estral. Nenhuma alteração significativa foi encontrada na capacidade máxima de ligação dos sítios de baixa afinidade ( $B_{max2}$ ); ou em suas constantes de dissociação ( $K_{d2}$ ). O único trabalho encontrado na literatura a avaliar estes parâmetros em cães através de estudos de ligação com  $^{125}$ I-insulina; verificando diferenças nas propriedades de ligação da insulina entre neonatos e cães adultos também não observou diferenças com relação aos sítios de baixa afinidade (JOHNSTON *et al.*, 1991). Estes achados motivam a especulação sobre o

caráter constitutivo e não passível de regulação dos receptores de baixa afinidade / alta capacidade.

É importante ressaltar que estes achados de menor sensibilidade à insulina foram no tecido muscular esquelético. Diferenças na sensibilidade à insulina são esperadas em diferentes tecidos alvo, como fígado, tecido adiposo sub-cutâneo, tecido adiposo intra-abdominal, tecido adiposo marrom e tecido muscular (GRIFFIN & OJEDA, 2004). O índice HOMA R, bem como o índice insulinogênico e a relação insulina/glicose corrigida são baseados em medidas estáticas, e desta forma avaliam basicamente a sensibilidade hepática à insulina (MATTHEWS *et al.*, 1985; OLIVEIRA, *et al.*, 2005). O uso de testes mais simples, como o índice HOMA, tem sido validado para uso clínico diante do padrão ouro para avaliação da sensibilidade à insulina (*clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico). A técnica do *clamp* apresenta a capacidade de avaliar tanto a resistência periférica como a hepática aos efeitos da insulina, assim como o IVGTT. (KIRWAN *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005). A ausência de alterações significativas nas respostas ao IVGTT, assim como nos índices calculados a partir da insulinemia e glicemia basais, permite inferir que o tecido muscular seria o principal sítio de resistência à insulina durante o diestro, apesar desta resistência não desencadear intolerância à glicose na população estudada.

Ryan & Enns (1988) avaliando a ligação da insulina em adipócitos de ratos, não observaram alterações na ligação em ratas prenhes, contudo; o transporte de glicose foi reduzido nestas células; sugerindo um defeito pós-receptor para esta alteração. Em estudo *in vitro* de cultura de adipócitos de ratos; o estradiol aumentou a ligação máxima, ao passo que a

progesterona reduziu não só a ligação mas também o transporte de glicose. O mesmo foi promovido pela prolactina (RYAN & ENNS, 1991). Vargas *et al.* (2004) estudaram alterações na concentração e distribuição celular de GLUT 4 em cadelas em anestro, obesas e diabéticas. A falta de trabalhos neste campo da pesquisa em diabetes mellitus canina dificulta a interpretação destes achados.

Após a ligação da insulina ao IR, ocorre a autofosforilação das sub-unidades  $\beta$  do receptor em resíduos de tirosina. A fosforilação destes resíduos estimula o recrutamento de moléculas intra-celulares chamadas de IRSs (substratos ao receptor de insulina), os quais sofrem fosforilação e intermediam os primeiros passos intra-celulares na propagação do sinal insulínico (PIROLA *et al.*, 2004). A capacidade de fosforilação destes receptores também foi avaliada neste trabalho, por meio da fosforilação do substrato sintético Poly (Glu;Tyr 4:1); o qual mimetiza o IRS-1 (KUCHARSKI *et al.*, 1999; ORCY *et al.*, 2005). A fosforilação do IRS-1 é considerada o primeiro passo intra-celular da transdução do sinal insulínico (SALTIEL & KAHN, 2001; PIROLA *et al.*, 2004; DOMINICI *et al.*, 2005). A fosforilação basal apresentou-se reduzida nas pacientes em estro e diestro quando comparadas aquelas dos animais em anestro.

O principal marcador hormonal da fase estrogênia do ciclo estral canino é o estradiol, que aumenta durante o pró-estro e reduz durante o estro. Apesar da progesterona ser o marcador hormonal do diestro; seus níveis começam a elevar-se já no começo do pró-estro em decorrência do aumento da atividade folicular (HOFFMANN *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2003; RODRIGUES & RODRIGUES, 2002). A maior secreção de GH pela glândula mamária foi

evidenciada em cadelas em resposta a exposição à progesterona (SELMAN *et al.*, RIJINBERK *et al.*, 2003). Dominici *et al.* (2005) propõem uma série de mecanismos pelos quais o GH pode promover seus efeitos diabetogênicos, dentre os quais é proposto que a exposição crônica ao GH está associada à menor resposta à insulina em termos de IR, IRS-1 e outros mensageiros intra-celulares no músculo esquelético. A modulação da sensibilidade à insulina pelo GH parece envolver também uma maior expressão de proteínas SOCS e maior fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina.

De uma forma geral, as diferentes fases do ciclo estral não mostraram alterações de sensibilidade à insulina; uma vez que diferentes provas de sensibilidade ao hormônio (glicemia de jejum, lipemia, fructosamina, IVGTT, HOMA B, HOMA R,  $\Delta$ Ins/ $\Delta$ Gli 5 min. IVGTT, índice insulinogênico e relação insulina / glicose corrigida) falharam em demonstrar um estado de resistência insulínica durante as fases de estro ou de diestro, apesar dos intervalos de confiança das razões de prevalência chamarem a atenção para o risco no estro e no diestro.

No entanto importantes alterações nos receptores e nas etapas pós-receptor foram identificadas e abrem caminhos para investigações com relação à modulação molecular da sensibilidade à insulina durante o ciclo estral. Atualmente, desconhece-se o papel de eventos ou defeitos nos receptores de insulina ou em passos pós-receptor na etiologia do diabetes mellitus canino (FELDMAN & NELSON, 2004).

Concluindo, as fases do ciclo estral promovem uma menor sensibilidade do IR frente à insulina, no entanto esta é compensada por um aumento na concentração do IR, de forma que a

sensibilidade tecidual à insulina é pouco afetada. A falha neste mecanismo compensatório pode ser o fator determinante do desenvolvimento de DM em fêmeas durante o diestro. Esta nova proposta fisiopatológica do desenvolvimento do diabetes canino vem complementar as hipóteses já citadas (EIGENMANN *et al.*, 1983; RYAN & ENNS, 1988; SCARAMAL *et al.*, 1997) para explicar a maior prevalência de DM durante o diestro em cães (RAND *et al.*, 2004; PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005; CATCHPOLE *et al.*, 2005).

## CAPÍTULO II

### Influência do Complexo Hiperplasia Endometrial Cística – Piometra sobre a Sensibilidade à Insulina

#### RESULTADOS

##### Animais

Após a análise dos critérios de inclusão e os resultados de citologia vaginal, de histopatologia uterina e de hemograma, 13 pacientes compuseram o grupo hiperplasia endometrial cística (HEC)- piometra, sendo 5 classificadas no grupo HEC (2 Filas, 1 Cocker, 1 Dobermann e 1 Rottweiler) e as outras 8 classificadas no grupo piometra (2 SRD, 2 Collies, 1 Boxer, 1 Fila Brasileiro, 1 Weimaraner e 1 Pastora Branca). A composição dos grupos HEC e piometra foi feita de acordo com os achados da histopatologia uterina, segundo critérios descritos por Dow (1957). Por tratar-se de morbididades associadas ao diestro (SMITH, 2006), como controle foram utilizadas as pacientes do grupo diestro (6 SRD, 2 Cockers, 1 Boxer, 1 Akita, 1 Rottweiler, 1 Fox e 1 Pitt-Bull).

As médias da idade e do peso das cadelas HEC e piometra foram significativamente maiores que aqueles verificados nos animais do grupo controle diestro. Foi observada diferença significativa do escore corporal entre as cadelas em diestro e aquelas HEC, porém sem relevância biológica (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Média, desvio padrão e intervalo de idade, peso e escore corporal das pacientes avaliadas dentro do grupo hiperplasia endometrial cística - piometra.

<b>Grupo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Escore Corporal</b>
<b>Diestro (n = 14)</b>	3,65 ± 3,25 (0,7 – 10)	16,6 ± 8,5 (6,1 – 26,6)	3,15 ± 0,31 (3 – 3,5)
<b>HEC (n = 5)</b>	9 ± 1,87 (6 – 11)*	29,7 ± 13,6 (10 – 43)*	2,5 ± 0,61 (2 – 3,5)*
<b>Piometra (n = 8)</b>	7,12 ± 3,09 (4 – 13)*	27,7 ± 11,3 (17 – 53)*	3 ± 0,26 (2,5 – 3,5)

\* indica diferença significativa com relação ao grupo controle / diestro,  $p < 0,05$  (ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey).

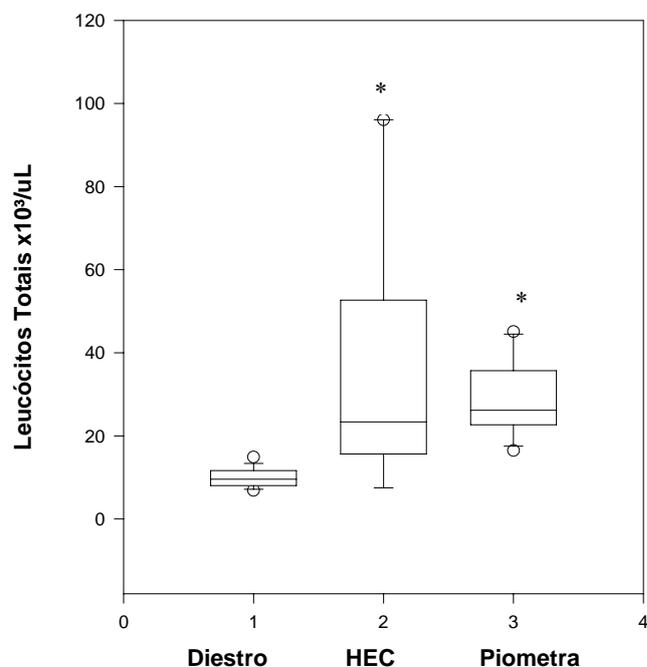
### **Determinações Hematológicas**

A **tabela 8** apresenta os valores do eritrograma dos grupos de cadelas HEC, piometras e controles (diestro). Não foram constatadas variações significativas dos valores de hemoglobina, eritrócitos e hematócrito entre os diferentes grupos experimentais.

Na **figura 17** estão representados os valores de leucócitos totais sanguíneos nos diferentes grupos experimentais estudados. As pacientes dos grupos HEC e piometra apresentaram valores de leucócitos significativamente maiores que aquele observado no grupo diestro. Contudo, não foi verificada diferença significativa entre os grupos HEC e piometra.

**Tabela 8.** Média, desvio padrão e intervalo dos parâmetros hematológicos (eritrócitos, hematócrito e hemoglobina) das pacientes avaliadas dentro do grande grupo hiperplasia endometrial cística - piometra.

<b>Grupo</b>	<b>Eritrócitos (<math>\times 10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	<b>Hematócrito (%)</b>	<b>Hemoglobina (g/dL)</b>
<b>Diestro</b>	7,06 ± 1,13 (5,42 – 7,9)	49,1 ± 8,5 (40 – 60)	16,7 ± 2,6 (13,9 – 21,6)
<b>HEC</b>	4,68 ± 1,57 (2,6 – 6,35)	31,6 ± 11,9 (16 – 47)	11,04 ± 4,1 (5,7 – 16,5)
<b>Piometra</b>	4,32 ± 1,07 (3,9 – 5,54)	31,68 ± 8 (29 – 41)	10,76 ± 2,7 (9,9 – 14,2)



**Figura 17.** Medianas, intervalos interquartis e percentis 10 e 90% dos valores de leucócitos totais observados nos diferentes grupos. \* representa diferença significativa através da análise variância de uma via, seguido do teste de Tukey ( $p = 0,004$ ).  $n = 5 - 14$ .

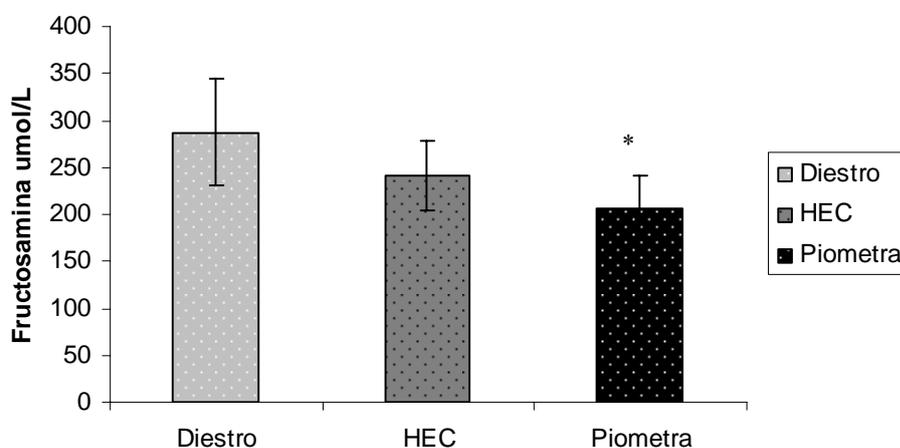
### Determinações Bioquímicas

Na **tabela 9** estão representados os resultados de triglicerídeos e de colesterol dos grupos diestro, HEC e piometra. Não foram observadas diferenças significativas dos valores de triacilglicerol e de colesterol entre os grupos experimentais estudados.

As concentrações séricas de fructosamina nos grupos diestro, piometra e HEC estão representadas na **figura 18**. No grupo piometra foi constatada uma diminuição significativa da concentração de fructosamina quando comparada aquela verificada no grupo controle diestro. Entre os outros grupos não foram verificadas diferenças significativas.

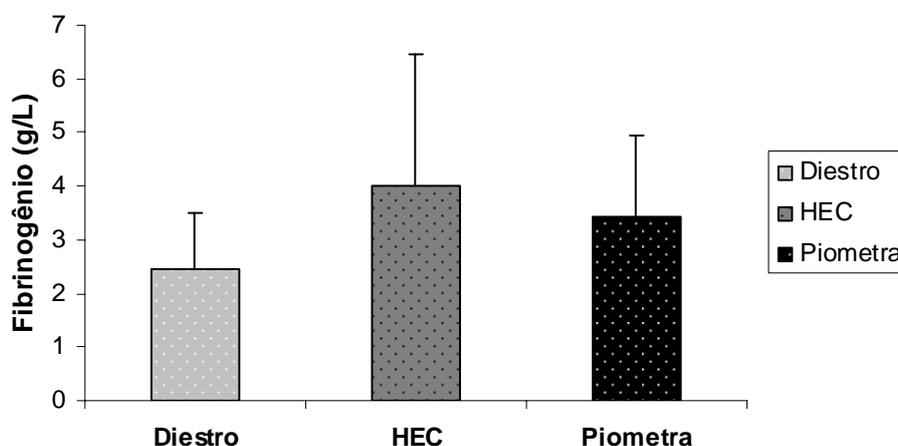
**Tabela 9.** Valores (média  $\pm$  desvio padrão da média e intervalo) de triglicerídeos e de colesterol séricos das pacientes em diestro (controles), com HEC e com piometra. Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na análise de variância de uma via.

	Triglicerídeos (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
<b>Diestro</b>	82,2 $\pm$ 38,7 (42,2 – 179,68)	156,45 $\pm$ 47,3 (79 – 236)
<b>HEC</b>	93 $\pm$ 47,4 (66,4 – 159,4)	140,6 $\pm$ 33,6 (101,7 – 179,21)
<b>Piometra</b>	86,4 $\pm$ 32,7 (46,9 – 161,7)	199,8 $\pm$ 105,1 (111,7 – 406,9)



**Figura 18.** Valores (média  $\pm$  desvio padrão da média) de fructosamina no soro dos grupos diestro, HEC e piometra. \* representa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os grupos diestro e piometra. ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey.  $n = 5 - 14$ .

As concentrações de fibrinogênio plasmático nos grupos experimentais diestro, HEC e piometra estão representadas na **figura 19**. Não foram verificadas variações significativas ( $p>0,05$ ) dos valores de fibrinogênio entre os grupos estudados. Porém, os valores de fibrinogênio nos grupos HEC e piometra foram cerca de 63% e 40%, respectivamente, maiores que aqueles verificados no grupo diestro.



**Figura 19.** Valores (média  $\pm$  desvio padrão da média) de fibrinogênio plasmático dos grupos diestro, HEC e piometra.  $n = 5 - 14$ .

### Teste de Tolerância à Glicose Intra-Venosa (IVGTT)

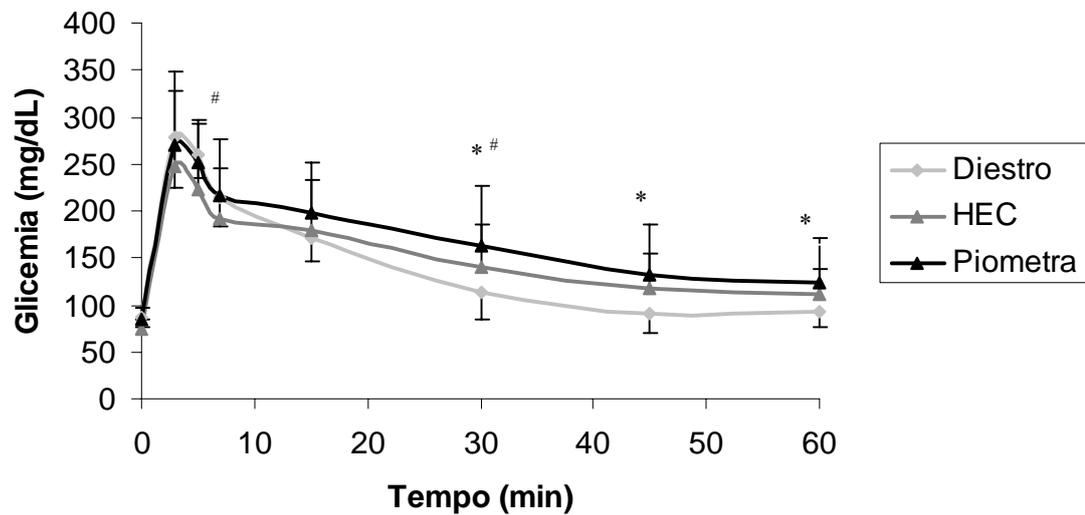
Os resultados de glicemia e de insulinemia basais, e os valores observados nos tempos de IVGTT avaliados foram analisados por meio da análise de variância com medidas repetidas e comparação por contrastes. Na **figura 20** estão representados os valores de glicose plasmática basal e durante o IVGTT em cadelas em diestro, HEC e piometra. Não foram verificadas

diferenças significativas dos valores de glicose plasmática basais entre os três grupos experimentais estudados.

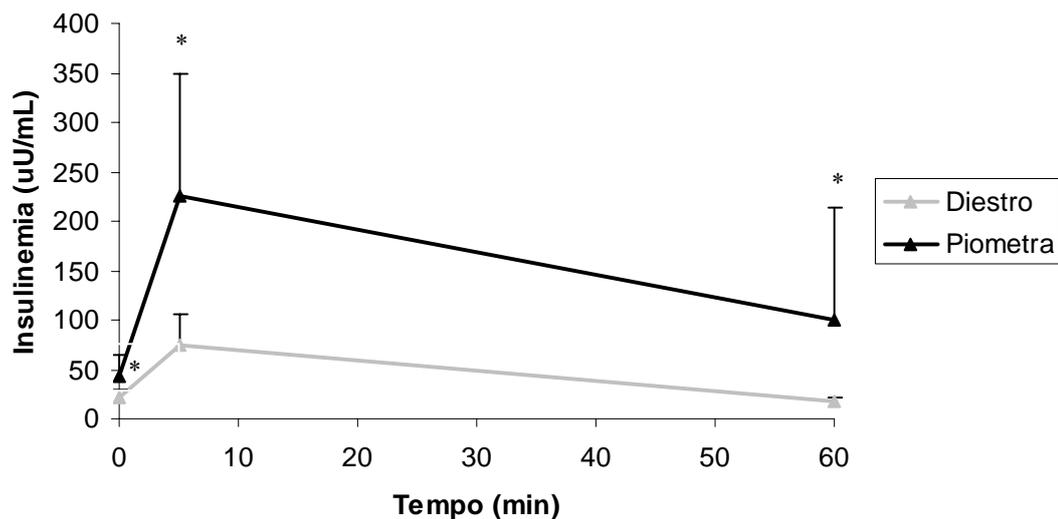
Contudo, observou-se diferença significativa entre os grupos HEC e piometra em comparação ao grupo diestro nos tempos 30 ( $p < 0,001$ ), 45 ( $p = 0,002$ ) e 60 ( $p = 0,026$ ) minutos de IVGTT. Nos tempos 7 ( $p = 0,043$ ) e 30 ( $0,019$ ) minutos foram constatadas diferenças significativas entre os grupos HEC e piometra (**Figura 20**). Com respeito a insulinemia ao longo do IVGTT; a interação dos fatores tempo mais grupo não foi significativa ( $p = 0,073$ ), sendo significativo somente o fator grupo (diestro *vs.* Piometra,  $p < 0,0001$ ) (**Figura 21**) com valores mais elevados de insulinemia nas pacientes com piometra nos tempos de IVGTT estudados.

As **Figuras 22 a e b** representam os valores dos índices de atividade de células  $\beta$  (HOMA B) e de resistência à insulina (HOMA R), calculados com base nos resultados de glicemia e insulinemia basais. No grupo piometra, o índice HOMA B apresentou um aumento significativo ( $p = 0,038$ ) em relação ao grupo diestro pelo teste de Mann-Whitney. Da mesma forma o índice HOMA R de resistência à insulina apresentou uma diferença significativa pelo teste *t* de Student ( $p = 0,029$ ) entre o grupo piometra e o grupo diestro.

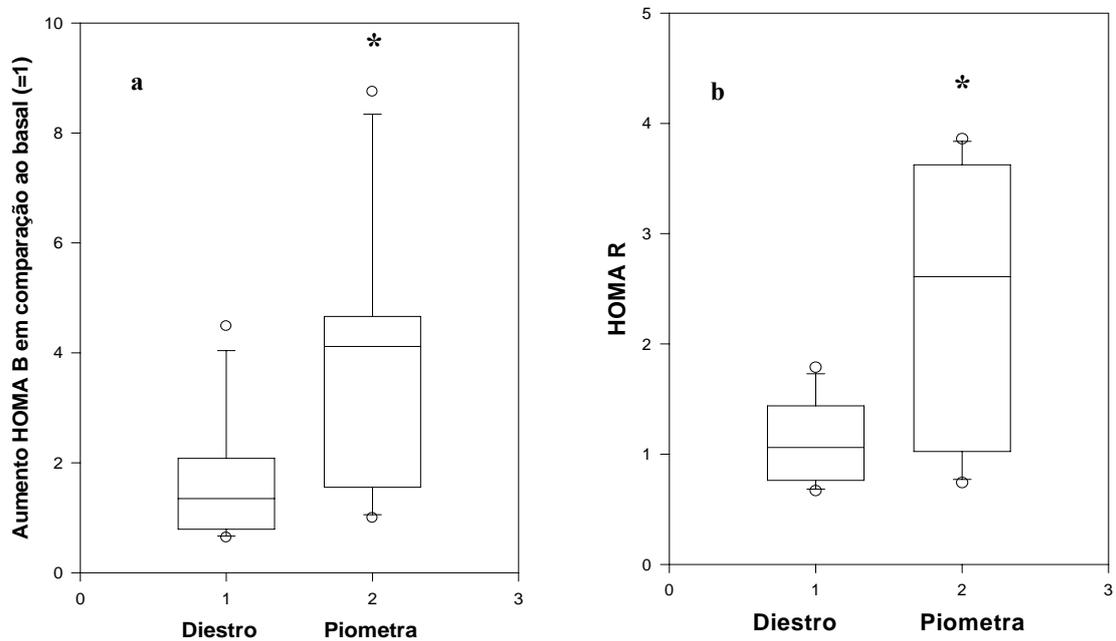
Também foi calculada a relação entre a resposta glicêmica e insulínica aos 5 minutos do IVGTT ( $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$ ) (**Figura 23**). As pacientes com piometra apresentaram um  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT significativamente maior ( $p = 0,023$ ) que aquelas do grupo diestro, quando analisadas pelo teste *t* de Student.



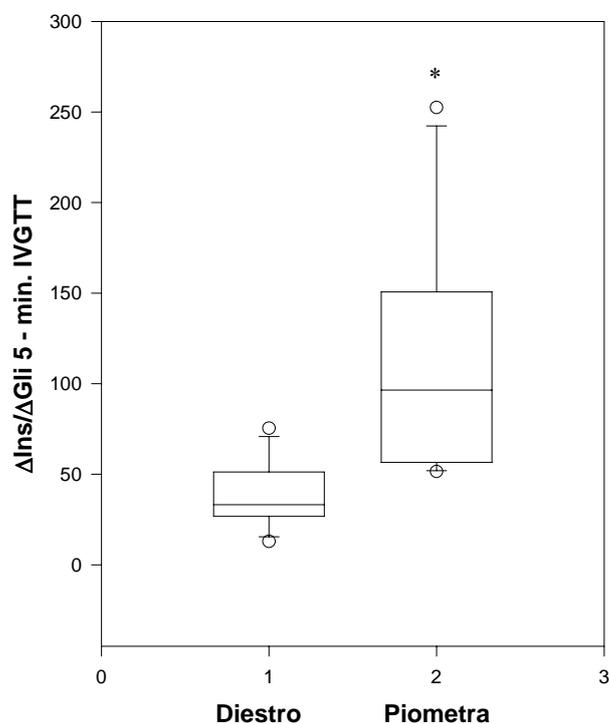
**Figura 20.** Valores médios de glicemia nos grupos diestro, HEC e piometra ao longo do IVGTT. # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre HEC e piometra. \* representa diferença significativa entre HEC e piometra com relação ao grupo diestro (análise de variância para medidas repetidas com comparação de contrastes).



**Figura 21.** Valores médios de insulinemia obtidos nos grupos diestro e piometra ao longo do IVGTT. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo piometra e o grupo diestro (análise de variância para medidas repetidas com comparação de contrastes).



**Figura 22a.** Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do aumento no índice HOMA B em relação ao basal (grupo anastro = 1) dos grupos diestro e piometra. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Mann-Whitney. **Figura 22b.** Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do índice HOMA R dos grupos diestro e piometra. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste  $t$  de Student.



**Figura 23.** Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT dos grupos diestro e piometra. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste  $t$  de Student.

Ainda com base nas concentrações de glicose e de insulina no tempo zero do IVGTT (jejum), foram calculados os índices insulinogênico e a relação insulina/glicose corrigida. Segundo Kogika *et al.* (2001), considera-se o paciente com hiperinsulinemia relativa, quando o índice insulinogênico ultrapassar o valor de 0,235 e a relação insulina/glicose corrigida passar de 30. A **tabela 10** apresenta as médias, desvio padrão e intervalo dos índices calculados. Ambos índices apresentaram-se bons indicadores de resistência à insulina ( $p = 0,032$  e  $p = 0,03$  respectivamente), apresentando valores significativamente maiores no grupo piometra em comparação ao grupo diestro pelo teste  $t$  de Student.

**Tabela 10.** Médias, desvio padrão e intervalo do índice insulinogênico e da relação insulina/glicose corrigida.

	<b>Índice Insulinogênico*</b>	<b>Relação Ins / Gli Corrigida**</b>
<b>Diestro</b>	0,250 ± 0,12 (0,131 – 0,418)	39,1 ± 22,04 (19,37 – 80,8)
<b>Piometra</b>	0,504 ± 0,24 (0,162 – 0,805) <sup>#</sup>	78,35 ± 36,46 (25,09 – 122,9) <sup>#</sup>

\* valor de referência: aumentado > 0,235.\*\* valor de referência: aumentado > 30. <sup>#</sup> diferença significativa em relação ao grupo diestro (p < 0,05).

### **Correlações de Pearson e Odds ratio**

Frente à diferença significativa entre idade e peso das pacientes com piometra em comparação as pacientes em diestro; foi determinada a correlação linear de Pearson entre leucograma, idade e peso e os índices de sensibilidade à insulina calculados a partir dos resultados do IVGTT. A correlação entre os fatores de confusão leucograma, idade e peso também foi determinada. A **tabela 11** apresenta os valores de  $r^2$ , r de Pearson e valor do p das correlações realizadas. O leucograma foi a variável que melhor se relacionou com os índices de sensibilidade à insulina, sendo significativa a correlação (p < 0,05) para HOMA R,  $\Delta$ Ins/ $\Delta$ Gli aos 5 minutos de IVGTT, índice insulinogênico e relação insulina/glicose corrigida. A variável peso só apresentou correlação com o HOMA R; enquanto a idade apresentou correlação somente com o HOMA B. Não foi observada correlação significativa entre leucograma, peso ou idade (p > 0,05).

A partir das diferenças observadas entre os índices de sensibilidade à insulina foi calculada a razão de chances (*odds ratio* – OR) das pacientes com piometra (fator de exposição)

apresentarem resistência à insulina (evento) em comparação as pacientes em diestro (grupo não exposto) sendo possível a determinação do OR médio (**tabela 12**). Para o cálculo do OR dos índices HOMA B e HOMA R foram considerados como resistentes as pacientes com valor superior a media do grupo anestro mais dois desvios padrão. Para cálculo do OR dos índices  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT, índice insulinogênico e relação insulina/glicose corrigida foram adotados os pontos de corte descritos nos trabalhos originais (i.e.,  $< 54$  para  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT;  $> 0,235$  para índice insulinogênico e  $> 30$  para relação insulina/glicose corrigida – OMORI *et al.*, 1992; KOGIKA *et al.*, 2001; FELDMAN & NELSON, 2004). Contudo para cálculo do OR médio não foi considerado o parâmetro  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT. Para cada OR foi calculado o intervalo de confiança 95% (IC 95%), sendo que para o OR médio, também foi calculado o intervalo de confiança 99% (IC 99%).

Apesar dos elevados OR calculados para os índices de sensibilidade à insulina, HOMA B, HOMA R, índice insulinogênico e relação insulina/glicose corrigida, terem apresentando nulidade de associação (IC 95% passando pelo valor 1 = trivial); o cálculo do OR médio (7,58) apresentou significância em ambos níveis ( $\alpha$  0,05 e 0,01). O OR do  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT apresentou associação negativa significativa (OR  $< 1$ ).

**Tabela 11.** Resultados de  $r^2$ ,  $r$  de Pearson e valores de  $p$  das variáveis de sensibilidade à insulina correlacionadas aos fatores de confusão leucograma, idade e peso.

Variáveis correlacionadas	$r^2$	$r$ de Pearson	Valor de $p$
Leucograma vs. HOMA B	0,073	0,272	0,346
Leucograma vs. HOMA R	0,502	0,709	< 0,01*
Leucograma vs. $\Delta$ Ins/ $\Delta$ Gli 5 min IVGTT	0,305	0,553	0,040*
Leucograma vs. Índice insulinogênico	0,421	0,649	0,012*
Leucograma vs. Ins/Gli corrigida	0,381	0,618	0,0186*
Idade vs. HOMA B	0,638	0,799	< 0,001*
Idade vs. HOMA R	0,244	0,494	0,072
Idade vs. $\Delta$ Ins/ $\Delta$ Gli 5 min IVGTT	0,152	0,390	0,168
Idade vs. Índice insulinogênico	0,145	0,382	0,178
Idade vs. Relação Ins/Gli corrigida	0,164	0,406	0,150
Peso vs. HOMA B	0,142	0,378	0,183
Peso vs. HOMA R	0,368	0,607	0,021*
Peso vs. $\Delta$ Ins/ $\Delta$ Gli 5 min IVGTT	0,205	0,453	0,104
Peso vs. Índice insulinogênico	0,172	0,415	0,140
Peso vs. Relação Ins/Gli corrigida	0,153	0,392	0,166
Peso vs. Leucograma	0,235	0,485	0,078
Peso vs. Idade	0,240	0,490	0,075
Idade vs. Leucograma	0,104	0,324	0,258

\* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para análise de correlação de Pearson.

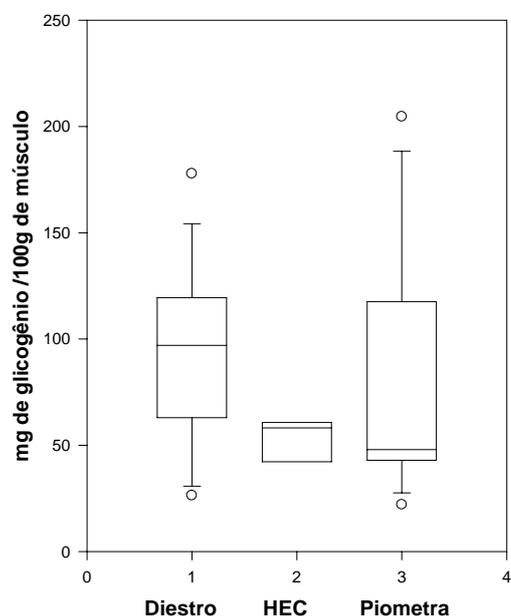
**Tabela 12.** Razão de chances (*odds ratio*) e intervalos de confiança de resultados alterados nos testes de sensibilidade à insulina realizados.

<b>Índice Calculado</b>	<b>Odds ratio (Intervalo de Confiança 95%)</b>
<b>HOMA B</b>	5,0 (0,74 – 33,44)
<b>HOMA R</b>	12,0 (0,8 – 177)
<b><math>\Delta</math>Ins/<math>\Delta</math>Gli 5 min IVGTT</b>	0,03 (0,001 – 0,6) <sup>#</sup>
<b>Índice insulinogênico</b>	6,66 (0,49 – 82,2)
<b>Relação Ins/Gli corrigida</b>	6,66 (0,49 – 82,2)
<b>OR médio (IC 95% da média)</b>	<b>7,58 (3,84 – 11,32)*</b>
<b>OR médio (IC 99% da média)</b>	<b>7,58 (1,37 – 13,79)**</b>

<sup>#</sup> representa associação não nula (IC não inclui o valor 1). \* representa associação não nula para um  $\alpha$  95% e 3 gl. \*\* representa associação não nula para um alfa de 99% e 3 gl.

### **Determinação do Glicogênio Muscular**

A **Figura 24** representa os valores de glicogênio muscular nos diferentes grupos experimentais estudados. Não foram constatadas diferenças significativas na concentração de glicogênio muscular após o IVGTT entre os grupos experimentais diestro, HEC e piometra.



**Figura 24.** Medianas, amplitude interquartil e percentis 10 e 90% do glicogênio muscular das pacientes nos grupos diestro, HEC e piometra. Não foi observada diferença significativa pela ANOVA de uma via ( $p = 0,465$ ).  $n = 4$  a 12 animais por grupo.

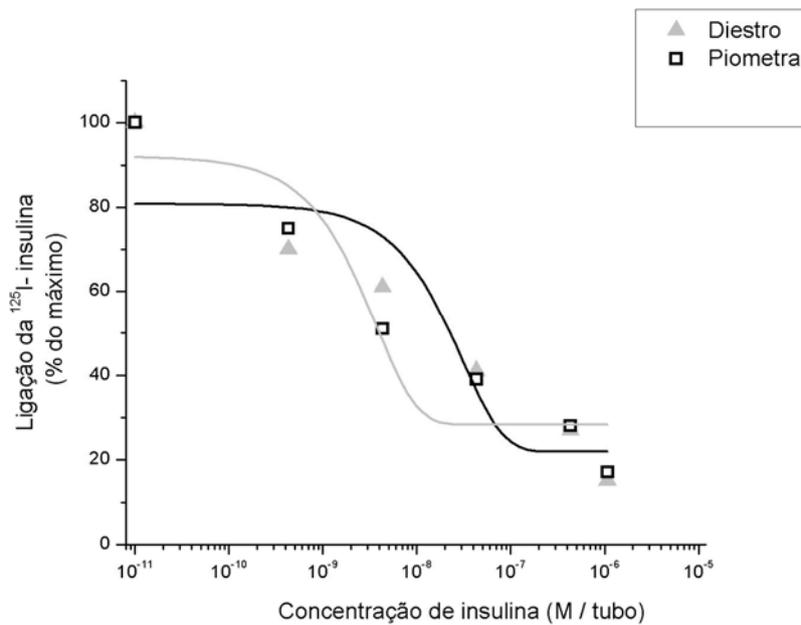
### Ensaio de Ligação da $^{125}\text{I}$ -Insulina em Presença de Diferentes Concentrações de Insulina Humana

Os ensaios de ligação da  $^{125}\text{I}$ -Insulina em presença de concentrações crescentes de insulina não marcada evidenciou, por meio da análise de saturação com hormônio não marcado com o programa *Kell for Windows*, sítios de ligação à insulina de alta e baixa afinidade. A constante de dissociação destes sítios (Kds) serão aqui referidos como Kd 1 e Kd 2, respectivamente. A capacidade máxima de ligação destes sítios também foi determinada sendo aqui referida como Bmax 1 e Bmax 2. Os valores de Kd e Bmax para os sítios de alta afinidade

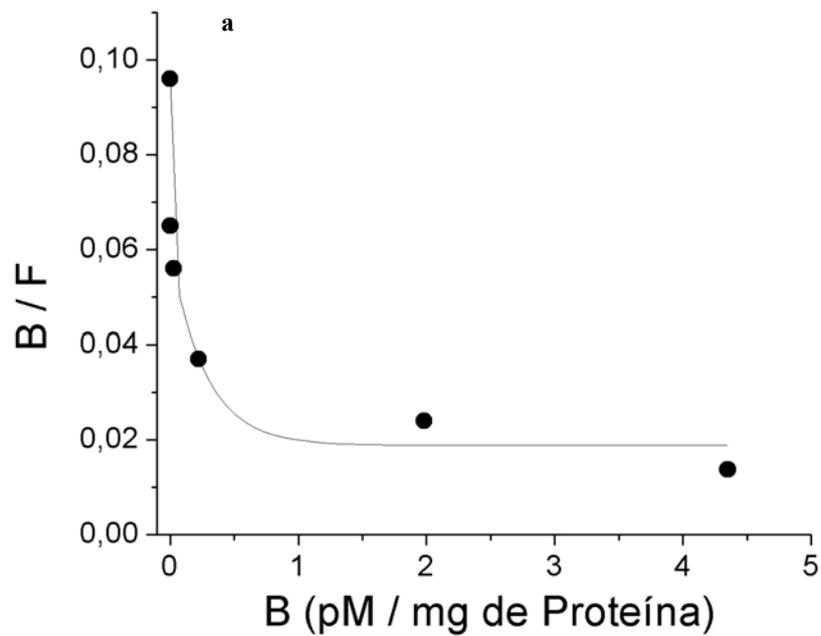
foram expressos em fM/mg de proteína, enquanto que para os sítios de baixa afinidade; os valores de Kd e Bmax foram expressos em pM/mg de proteína.

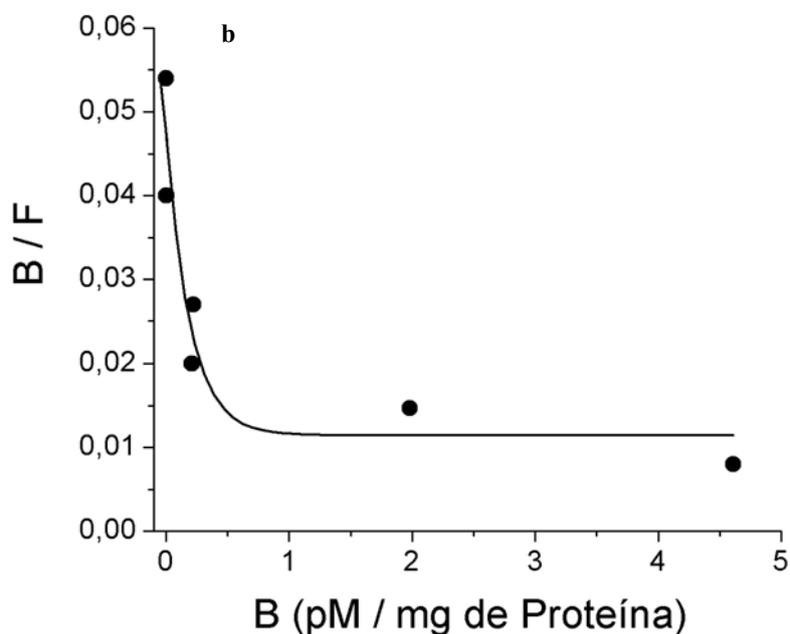
A **figura 25** apresenta as curvas de inibição competitiva da ligação de  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas de músculo esquelético, pelo aumento da concentração de insulina humana não marcada. As **figuras 26 a e b** apresentam as curvas de Scatchard elaboradas a partir das curvas de competição entre  $^{125}\text{I}$ -insulina e insulina humana não marcada em tecido muscular das pacientes em diestro e com piometra. A relação da insulina ligada/livre (*Bound/Free* – B/F) foi representada graficamente contra a quantidade de insulina ligada (*Bound* – B) por pM de proteína. A relação curvilínea observada nestes gráficos demonstra a presença de sítios de alta e baixa afinidade.

A **tabela 13** representa os resultados obtidos de Kd e Bmax para cada sítio de ligação à insulina em tecido muscular de cadelas nas diferentes em diestro ou com piometra. As pacientes com piometra apresentaram o Kd 1 quase três vezes maior que aquele encontrado em pacientes em diestro ( $p = 0,004$ ). Apesar da observação de maiores valores de Bmax 1 nas pacientes com piometra e de maiores valores de Bmax 2 nas pacientes em diestro; estas diferenças não foram significativas ( $p = 0,158$  e  $p = 0,092$  respectivamente). Quanto aos valores de Kd 2 não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos ( $p = 0,970$ ). Todos os parâmetros foram analisados através de teste *t* de Student.



**Figura 25** - Inibição competitiva da ligação de  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas de músculo esquelético, pelo aumento da concentração de insulina humana não marcada. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata.





**Figura 25 a e b** - Curvas de Scatchard em preparações de membrana de tecido muscular esquelético de fêmeas caninas durante o diestro e em fêmeas com piometra. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata. Curvas representativas dos grupos diestro (a) e piometra (b).

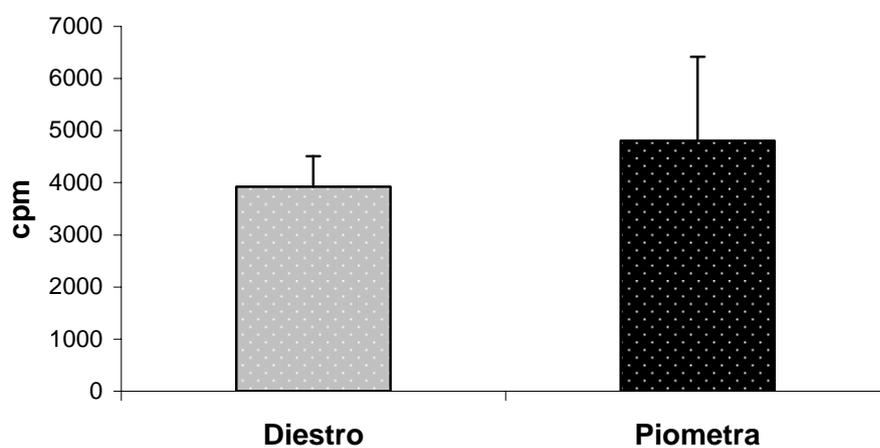
**Tabela 13.** Média e desvio padrão dos valores de Kd (constante de dissociação) dos sítios de ligação da insulina de alta (Kd 1) e de baixa (Kd 2) afinidade e a capacidade de ligação máxima destes sítios (Bmax 1 e Bmax 2) nas pacientes em diestro ou com piometra.

	<b>Kd 1</b> (fM/mg ptn)	<b>Bmax 1</b> (fM/mg ptn)	<b>Kd 2</b> (pM/mg ptn)	<b>Bmax 2</b> (pM/mg ptn)
<b>Diestro</b>	15,56 ± 3,88	1,24 ± 0,24	18,56 ± 7,36	0,77 ± 0,37
<b>Piometra</b>	41,04 ± 16,95*	2,09 ± 1,35	18,37 ± 11,8	0,49 ± 0,23

\* Representa diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo controle (diestro) pelo teste  $t$  de Student.  $n = 8$  animais por grupo.

### Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu,Tyr 4:1)

A **Figura 27** representa os resultados de fosforilação basal nas preparações de membrana de músculo de cadelas em diestro ou com piometra. Os resultados de fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr 4:1) não apresentaram diferenças significativas, por meio de teste *t* de Student, entre as pacientes em diestro e as pacientes com piometra.



**Figura 27.** Médias e desvio padrão dos valores de fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr 4:1) em preparações de membrana de tecido muscular esquelético de pacientes em diestro ou com piometra. n = 6 animais por grupo.

## DISCUSSÃO

A maior incidência do complexo HEC-P por volta dos 9 anos de idade e a maior predisposição de certas raças à doença; como o Rottweiler, o Pastor Alemão e o Collie (raças do grupo HEC ou piometra) justificam a diferença significativa observada entre a idade e os pesos das pacientes dos grupos HEC e piometra quando comparados aqueles do grupo controle diestro (NISKANEN & THRUSFIELD, 1998). A diferença significativa na idade e no peso das pacientes do grupo HEC-P poderia representar fatores de confusão na interpretação dos resultados. Primeiramente, pode-se esperar uma menor sensibilidade à insulina em pacientes mais idosas (FELDMAN & NELSON, 2004), assim como em pacientes com maior peso, representando maior porte das pacientes (uma vez que para serem admitidas no estudo a condição eutrófica foi um critério de inclusão). Cães de grande porte apresentam maior secreção do hormônio GH durante o crescimento (FAVIER *et al.*, 2001) e também maior concentração de somatotrofos na hipófise (KROOK *et al.*, 1960). A análise da correlação de Pearson entre as variáveis, idade, peso e leucograma (indicador de estado inflamatório) não foi significativa ( $r < 0,5$ ;  $p > 0,05$ ).

Também como critério de inclusão nos grupos HEC e piometra, foi adotada a presença de leucocitose como um indicador de processo inflamatório/infeccioso (THRALL, 2004). Feldman & Nelson (2004) salientam o potencial de resistência à insulina frente a qualquer moléstia inflamatória, infecciosa, hormonal ou neoplásica. A ocorrência do complexo HEC-P atende a todas estas condições; exceto a de moléstia neoplásica. Contudo, estes animais apresentam hiperplasia endometrial (ARORA, *et al.*, 2006; SMITH, 2006). O fibrinogênio

plasmático é considerado uma proteína de fase aguda, cuja concentração plasmática aumenta frente a um processo inflamatório (THRALL, 2004). No presente estudo, não foram constatadas diferenças significativas nas concentrações do fibrinogênio plasmático entre os grupos experimentais estudados, apesar de valores acima do limite de referência (2-4 g/L) terem sido evidenciados nas pacientes dos grupos HEC e piometra.

A diferenciação entre o quadro de HEC e de piometra pode ser estabelecida pelo o hemograma, os sinais clínicos e a determinação da proteína C reativa; com até 97% de segurança (FRANSSON *et al.*, 2004). No presente estudo a diferenciação entre estes dois quadros patológicos (HEC e piometra) foi feita de acordo com critérios definidos por Dow (1959a,b), que distinguiu quatro estágios histopatológicos do complexo HEC-P. Os estágios I (HEC não complicada) e II (HEC com infiltrado plasmocitário) foram considerados como HEC. Os estágios III (HEC com endometrite aguda) e IV (HEC com endometrite crônica) foram considerados como piometra. A análise da apresentação clínica das pacientes, respostas à terapia e às provas de sensibilidade à insulina, risco anestésico ou mesmo resposta do hemograma e do fibrinogênio plasmático não foram úteis para a diferenciação entre o complexo HEC e P; assim foi adotado como critério na separação dos grupos a histologia do útero.

A síndrome sepse representa um espectro de alterações patofisiológicas que resultam de uma resposta inflamatória exuberante pelo hospedeiro em resposta a um evento estimulador específico (BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996; DAS, 2003a). A inflamação apresenta um papel fundamental no processo de morte dos patógenos ao criar um ambiente hostil via produção de moléculas oxidantes e ativação dos linfócitos B e T (GRIMBLE, 2002). O quadro

clínico da síndrome sepse pode variar de alterações fisiológicas moderadas a severa disfunção múltipla de órgãos e a morte (BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996). Durante uma resposta inflamatória aguda ocorre uma alteração metabólica de forma a permitir uma maior aporte de nutrientes para o sistema imunológico (SI). Assim, a presença de um estado de resistência à insulina moderado, promove uma menor captação de glicose pelos tecidos muscular e adiposo, favorecendo a utilização da glicose pelo SI. Da mesma forma, há uma tendência a hiperlipemia, especialmente hipertrigliceridemia (GRIMBLE, 2002). Citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  medeiam o aumento nos lipídeos, estimulam a gliconeogênese e a produção de hormônios diabetogênicos e reduzem a sensibilidade à insulina (BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996; GRIMBLE, 2002; DAS, 2003a).

Basso *et al.* (2006) evidenciaram que 54% das pacientes com piometra avaliadas apresentavam pelo menos dois sinais de cardinais de sepse; como leucocitose ou leucopenia, taquicardia, taquipnéia e hipo ou hipertermia. Todas as pacientes dos grupos HEC ou piometra do presente estudo apresentaram pelo menos dois destes sinais. Contudo; não foi observada correlação entre o estado inflamatório/infeccioso das pacientes com HEC-P, e aumento significativo nos parâmetros de lipemia avaliados.

A determinação do colesterol sérico aproximou-se da significância ( $p = 0,09$ ), o que deixa margem para discussão se uma possível diferença não poderia ter sido observada se fosse verificado o colesterol LDL e HDL, separadamente. Das (2003a) reporta a ocorrência de menores valores de colesterol HDL e maiores valores de VLDL, LDL, triglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres em pacientes humanos com sepse quando comparados aos controles

saudáveis. A principal lipoproteína nos cães é a HDL (BAILHACHE *et al.*, 2003). Eventuais reduções na sua concentração dificilmente teriam as mesmas repercussões observadas em humanos; como por exemplo, aterosclerose e maior risco cardiovascular; comumente associados à resistência à insulina e aos quadros inflamatórios/sépticos crônicos (GRIMBLE, 2002).

A redução significativa de captação de glicose promovido pelo estado inflamatório aumenta os valores de glicemia (DAS, 2003a). Maiores valores de HbA1c também já foram detectados em pacientes humanos sofrendo de quadros inflamatórios crônicos (GRIMBLE, 2002). A fructosamina, utilizada como um indicador das flutuações glicêmicas de curto prazo, representando a glicemia média das últimas semanas ( $\pm 2$  semanas), vem cada vez mais sendo utilizada para diagnóstico e monitoramento glicêmico em cães (LOSTE & MARCA, 2001). Contudo; neste estudo observa-se valores de fructosaminemia significativamente menores nas pacientes com piometra, quando comparado aqueles encontrados em fêmeas com HEC ou em diestro. A provável explicação para esse achado reside no fato de que a fructosamina deriva das proteínas séricas em especial da albumina (JENSEN, 1995). A concentração de fructosamina deve ser avaliada juntamente com a concentração plasmática total de proteínas e de albumina em especial, uma vez que a hipoproteinemia e a hipoalbuminemia podem facilmente provocar valores reduzidos de fructosamina (LOSTE & MARCA, 1999).

Apesar de no presente estudo não termos detectado diferenças significativas dos valores de proteína total (dados não apresentados), entre os grupos diestro, HEC e piometra, acredita-se que as fêmeas com piometra apresentaram, frente à intensa reação inflamatória, um aumento da síntese e liberação de globulinas. A redução na síntese de albumina em decorrência

da maior síntese de globulinas, com objetivo de manutenção do equilíbrio osmótico do líquido intra-vascular, pode ter promovido um estado de hipoalbuminemia, o qual justificaria os valores mais baixos de fructosamina no grupo piometra (KANeko *et al.*, 1997). O catabolismo protéico geralmente presente em quadros sépticos (GRIMBLE, 2002), levaria à redução na síntese de proteínas plasmática e conseqüentemente reduziria a formação de fructosamina no plasma (THRALL, 2004).

De fato, não foi detectada diferença significativa na concentração de glicose plasmática entre as pacientes em diestro ou em HEC-P. A ocorrência de hiperglicemia nas fases iniciais da síndrome sepse, assim como a hipoglicemia, característica da fase final de um quadro séptico (DAS, 2003a) não foram observadas neste estudo. A significativa diferença de idade entre as pacientes também não influenciou nos valores de glicemia basal, de acordo com achados de Faria *et al.* (2005). No entanto, a resposta glicêmica das pacientes com HEC ou piometra ao desafio com glicose foi significativamente diferente das pacientes em diestro, evidenciando intolerância à glicose. A intolerância à glicose foi mais evidente no grupo piometra que no grupo HEC; especialmente nos tempos 7 e 30 minutos de IVGTT, possivelmente, por alterações na primeira e na segunda fase de secreção de insulina. A insulinemia foi mensurada somente nas pacientes com piometra. A concentração de insulina circulante basal e durante o IVGTT foi significativamente maior nas cadelas com piometra, quando comparadas àquelas verificadas nas cadelas em diestro. Esse padrão de resposta evidencia não só o processo de intolerância à glicose, mas principalmente um quadro de resistência à insulina em decorrência do quadro infeccioso/inflamatório.

Das (2003a) sugere que a resistência à insulina presente em quadros sépticos possivelmente seja em decorrência de citocinas como por exemplo a IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ ; resultando em menor captação de glicose para os tecidos. A captação de glicose no tecido muscular durante a sepse deve-se em parte a uma maior expressão de GLUT-1, e a glicose captada é preferencialmente metabolizada a lactato; motivo pelo qual é comum ocorrência de hiperlactatemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia em pacientes com sepse (DAS, 2003a). Paradoxalmente, a redução da sensibilidade à insulina, que contribuiu para o processo patológico, pode apresentar um efeito benéfico na resposta à infecção e à injúria. Este estado de menor sensibilidade à insulina permite que o SI utilize esta glicose não captada, uma vez que não depende deste hormônio para captação de glicose (BESEDOVSKY & DEL REY, 1990). Além do mais, a secreção dos hormônios contra-reguladores à insulina aumenta o catabolismo protéico e modulam as ações anabólicas e anti-catabólicas da insulina sobre o metabolismo intermediário (GRIMBLE, 2002; DAS, 2003a).

Diversos mecanismos para a resistência insulínica presente em quadros inflamatórios/sépticos já foram descritos (GRIMBLE, 2002; DAS 2003a,b; KIM *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2006; JAGER *et al.* 2006). Alguns destes mecanismos puderam ser avaliados neste estudo. A avaliação dos índices de sensibilidade à insulina HOMA R, índice insulinogênico e relação insulina/glicose corrigida foram eficazes na demonstração de um estado significativo de resistência à insulina frente à condição piometra em comparação ao grupo diestro.

Apesar da ausência de valores de referência em cães para fins de comparação dos índices HOMA R e HOMA B prejudicar a análise do quadro de resposta insulínica as variações

glicêmicas (OLIVEIRA *et al.*, 2005), neste trabalho ficou claro a presença de uma resistência à insulina (HOMA R) associada a uma maior atividade das células  $\beta$  (HOMA B) em pacientes com piometra (MATTHEWS *et al.*, 1985). Katz *et al.* (2000) demonstraram a validade da utilização do índice HOMA em substituição ao uso do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico. De acordo com esta observação, a interpretação do  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT (Omori *et al.*, 1991) evidencia que as pacientes com piometra apresentam uma resposta esperada de secreção de insulina; especialmente quando comparadas as pacientes em diestro que apresentaram uma maior tendência a menor liberação de insulina, como evidenciado nos resultados do capítulo anterior.

O *odds ratio* médio, calculado para as alterações nos índices de sensibilidade à insulina utilizados neste trabalho, evidenciou que as pacientes com piometra apresentam 7,58 vezes mais chances de desenvolverem resistência à insulina quando comparadas a fêmeas em diestro.

Segundo diversos autores (Maedler *et al.*, 2002; Das 2003a; Wachlin *et al.*, 2003; Ohaha-Imaizumi *et al.*, 2004; Steer *et al.*, 2006) em quadros sépticos ocorreria menor secreção de insulina devido ao aumento, principalmente, na concentração de IL-1. Este mecanismo de hipo-secreção das células beta e estímulo à necrose em presença de IL-1 são semelhantes aqueles envolvidos na etiopatogênese do diabetes tipo I (MAEDLER *et al.*, 2002; OHAHA-IMAIZUMI *et al.*, 2004; STEER *et al.*, 2006). Contrariamente, neste trabalho foi observado em pacientes com piometra um aumento na secreção de insulina e uma resistência periférica à insulina, contudo, os valores de IL-1 não foram dosados nestas pacientes. Assim, a resistência à

insulina associada a uma maior resposta das células  $\beta$ , podem levar à exaustão da produção de insulina e ao estabelecimento de um quadro de DM, especialmente, em pacientes com outros fatores de risco associados; como idade avançada, diestro, alimentação desequilibrada e predisposição genética (RAND *et al.*, 2004).

Uma grande discussão envolve o uso de insulina em quadros sépticos não somente para estabilizar os níveis glicêmicos, mas com o objetivo de suprimir a síntese de MIF, TNF, IL-1, IL-6 e de radicais livres e aumentar a produção de interleucinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 que, sabidamente, são os efeitos anti-inflamatórios deste hormônio (KOGIKA *et al.*, 2001; DAS, 2003a,b). Kogika *et al.* (2001) ressaltam que em quadros sépticos é necessária uma avaliação cautelosa antes da indicação de terapia insulínica, que deve ser restrita aos pacientes com resistência periférica a ação do hormônio ou aqueles com redução na concentração sérica de insulina; uma vez que muitos pacientes apresentam-se hipoglicêmicos ou hiperinsulinêmicos durante as fases mais avançadas de um quadro séptico. No caso das pacientes com piometra, o uso de soluções glicosadas para fluidoterapia destas pacientes, procedimento de uso corrente na rotina hospitalar, também deve ser visto com cautela devido à resistência insulínica muitas vezes presentes nessa pacientes. Quando possível o uso da insulina corrige a hiperglicemia induzida por estresse, melhora a função do miocárdio (DAS, 2003a) e modula o processo inflamatório (DAS, 2003b), o que suporta o uso clínico de insulina, com ou sem potássio.

A idade e o peso médio das pacientes com HEC-P foram superiores aqueles verificados nas pacientes do grupo diestro. A determinação de qual fator, piometra, idade ou

peso, foi importante para a explicação da ocorrência da resistência à insulina em pacientes com piometra, foi realizada pela análise de correlação de Pearson. Esta ferramenta evidenciou que o leucograma apresentou correlação significativa com os índices HOMA R,  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT, índice insulinogênico e relação insulina/glicose corrigida. A idade apresentou correlação significativa somente com o HOMA B, enquanto o peso apresentou correlação significativa somente com o HOMA R. Desta forma, pode-se assumir que a maior idade e o maior peso das pacientes com piometra pouco influenciou o quadro de resistência à insulina, sendo o principal determinante desta resistência à insulina o quadro piometra; caracterizado pelos elevados valores de leucograma.

Na literatura consultada foram encontrados somente dois artigos que correlacionaram piometra à DM. Krook *et al.*, (1960), revisando arquivos de 10.993 necropsias no período de 1930 a 1957, evidenciaram 487 casos de piometra e 167 casos de diabetes. Os autores encontraram 5 casos onde co-existiram a condição piometra e diabetes; apesar de julgarem que esta associação provavelmente é maior, pois somente a análise dos arquivos de necropsia não permitiu a adequada identificação de mais casos de diabetes. Klinkenberg *et al.* (2006) sugerem a castração como um procedimento protetor contra o desenvolvimento de diabetes e para evitar ocorrência de piometra, apesar de não terem identificado casos de piometra antes do desenvolvimento de diabetes nos casos estudados em seu trabalho.

Pöpl & González (2005) relataram um caso de diagnóstico conjunto de diabetes e de piometra, marcado por poliúria, polidipsia, hiperglicemia e glicosúria. A castração da paciente não reverteu os sintomas de diabetes, assim, a terapia insulínica foi instituída para o controle a

longo prazo da glicemia da paciente (DMID). Pöpl *et al.* (2005) relataram a ocorrência de diabetes mellitus hiperosmolar não cetósico (DMHNC) em uma paciente diabética não castrada que veio a desenvolver piometra. O DMHNC é uma condição de extrema resistência à insulina (CAMPOS *et al.*, 2003), possivelmente, em decorrência do quadro séptico e agravado pela fase do diestro.

O estudo de Krook *et al.* (1960) evidenciou uma associação significativa entre obesidade, diabetes e piometra; o que eles denominaram síndrome da diabetes-obesidade-piometra; uma vez que 79% das pacientes com diabetes e 78% das pacientes com piometra eram obesas ou apresentavam sobrepeso; no entanto, os autores não definiram uma relação de causa-efeito para esta associação. Atualmente é conhecido o efeito pró-inflamatório da obesidade, mediado principalmente pela maior secreção de citocinas / hormônios, como o TNF- $\alpha$  e a leptina, assim como o papel destas adipocitocinas na redução da sensibilidade à insulina (GRIMBLE, 2002). Da mesma forma; a maior inter-conversão de hormônios esteróides pelo tecido adiposo pode estar envolvida na prevalência da ocorrência de piometra nas fêmeas com sobre peso (CORBOULD *et al.*, 2002; COSTA E DUARTE, 2006). Uma maior produção de estrógenos a partir da aromatização de andrógenos (BÉLANGER *et al.*, 2006) pode aumentar a sensibilidade do endométrio à progesterona (DHALIWAL *et al.*, 1999; BOSSCHERE *et al.*, 2002; VERVERIDIS *et al.*, 2004), o que em última análise, poderia estimular o desenvolvimento de HEC e de piometra (FAYRER-HOSKEN *et al.*, 1992; NISKANEN & THRUSFIELD, 1998).

A determinação do glicogênio muscular não foi eficaz em evidenciar prejuízos aos efeitos intra-celulares da insulina. No entanto menores concentrações de glicogênio muscular (valores não significativos) foram observadas em pacientes com HEC-P. A resistência à insulina presente nestas pacientes pode explicar estes valores reduzidos de glicogênio, pois a insulina estimula a síntese do glicogênio ativando a enzima glicogênio sintase e impede a glicogenólise via inibição da enzima glicogênio fosforilase (NEWSHOLME & DIMITRIADIS, 2001).

No primeiro capítulo deste trabalho foi demonstrado, pelo aumento significativo no Kd nos sítios de ligação à insulina de alta afinidade, que pacientes em diestro apresentam uma redução importante na afinidade entre a insulina e o IR. O aumento compensatório na capacidade total de ligação (Bmax) desses sítios foi capaz de compensar esta menor afinidade, motivo pelo qual as provas de sensibilidade à insulina mantiveram-se inalteradas.

Os experimentos de competição entre <sup>125</sup>I-insulina e insulina humana não marcada, com posterior análise dos resultados com o programa Kell / Ligand (MUNSON & RODBARD, 1980; McPHERSON, 1985) evidenciaram que a condição piometra reduz a afinidade hormônio-receptor dos sítios de alta afinidade de forma mais severa do que ocorre no diestro (valores de Kd quase três vezes maiores que no diestro e 4 vezes maiores que no anestro). No entanto um aumento compensatório na capacidade de ligação máxima (Bmax) destes sítios não foi observado, o que resulta em uma resistência tecidual à ação da insulina ainda mais intensa. A menor capacidade de ligação observada para os sítios de baixa afinidade (Bmax 2) não foi significativa, assim como observou-se no capítulo anterior deste trabalho onde não se encontrou diferenças significativas entre Bmax e Kds dos sítios de baixa afinidade. Johnston *et al.* (1991)

estudando a ligação insulina-receptor em tecidos de cães adultos e de filhotes não observaram diferenças nas características de ligação dos sítios de baixa afinidade. Estes achados sugerem que os receptores de baixa afinidade e alta capacidade seriam constitutivos. Assim a modulação fisiológica dos receptores de insulina seria via receptores de alta afinidade e baixa capacidade.

A resistência à insulina nas pacientes com piometra fica clara quando se compara a curva glicêmica destas pacientes com aquelas em diestro (controles), constatando-se uma redução dos valores glicêmicos mais lenta. Após 60 minutos da sobrecarga de glicose eles ainda acham-se 47% mais elevados que os valores iniciais. Nas cadelas em diestro, o retorno dos valores glicêmicos a valores semelhantes ao tempo 0 ocorre aos 45 minutos após a injeção de glicose.

Contudo, frente ao estado séptico/inflamatório das pacientes com piometra, também ficou evidente uma menor ação hepática da insulina através da análise dos valores do HOMA R, índice insulinogênico e relação insulina/glicose corrigida (OLIVEIRA *et al.*, 2005). A análise destes índices reflete principalmente a ação da insulina no fígado por utilizar no cálculo a mensuração de insulinemia e glicemia basal. Estes fatores associados provocaram uma maior resposta das células  $\beta$  frente ao quadro de resistência à insulina; identificado através da análise da resposta insulínica durante o IVGTT, assim como na avaliação dos índices HOMA B e  $\Delta\text{Ins}/\Delta\text{Gli}$  aos 5 minutos de IVGTT, o que a longo prazo pode servir como fator desencadeante de um estado diabético em decorrência de exaustão na produção de insulina.

Neste trabalho não foi verificada alteração significativa da fosforilação do substrato sintético poly (Glu:Tyr) nas pacientes com piometra quando comparadas as cadelas em diestro. Contudo, alguns trabalhos demonstram que a fosforilação do IR e IRS-1 está reduzida em quadros sépticos (DAS, 2003a); assim como, a fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina (KIM *et al.*, 2005) e a menor expressão do IRS-1 induzida pela IL-1 $\beta$  (JAGER *et al.*, 2006).

Outras causas já relatadas para as perturbações no metabolismo lipídico e da glicose, observadas nos quadros sépticos são: o desenvolvimento de auto-anticorpos contra o IR; efeito das endotoxinas semelhante à insulina (insulin-like), perturbações nas ações celulares da insulina pelas endotoxinas e alterações no padrão de secreção da insulina (DAS, 2003a). Não constam na literatura consultada trabalhos que tenham avaliado os receptores de insulina ou eventos pós-receptor em quadros sépticos em cães; como por exemplo, a condição HEC-P. Desta forma, este trabalho pela primeira vez evidência que um estado inflamatório/infeccioso crônico, como a piometra, é capaz de induzir profundas alterações metabólicas, resultando em resistência à insulina e risco de desenvolvimento de DM em cães. Trabalhos em humanos já associaram a ocorrência de estados inflamatórios/infecciosos crônicos e risco de diabetes (IACOPINO, 2001; SYRENICZ *et al.*, 2006).

Apesar deste trabalho não ter avaliado citocinas inflamatórias, pode-se inferir que o processo séptico/inflamatório induzido pelos microorganismos intra-uterinos ou toxinas (LPS) ativam linfócitos T e B para realizarem uma *up-regulation* de suas respostas imunológicas (DAS, 2003a). A ativação do receptor de LPS ativa o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que uma vez ativado induz a expressão de moléculas como o TNF- $\alpha$  e IL-1. Também moléculas como o

próprio TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 podem ativar o NF- $\kappa$ B. Estas moléculas estimulam a atividade citosólica da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), induzindo a liberação de ácido araquidônico e a produção de radicais livres e óxido nítrico livre, os quais apresentam potentes efeitos pró-inflamatórios (BLACKWELL & CHRISTMAN, 1996; GRIMBLE, 2002; DAS, 2003a). Os resultados deste estudo permitem supor que esta resposta intensa, com objetivo de resolver a injúria, através da criação de um micro-ambiente hostil aos patógenos; acabaram gerando um estado de menor ação hepática da insulina e resistência muscular ao hormônio, com conseqüente intolerância à glicose e hiperinsulinemia. Os achados deste trabalho evidenciaram no tecido muscular uma menor afinidade de ligação do hormônio aos receptores de insulina de alta afinidade, não acompanhada por uma maior capacidade de ligação. Este achado representa um maior risco de desenvolvimento de diabetes mellitus em pacientes pré-dispostas.

## CONCLUSÕES GERAIS

A maior ocorrência de diabetes durante o diestro nas fêmeas caninas parece envolver uma série de fatores predisponentes, da mesma forma que se observa no diabetes mellitus gestacional em humanos. A ocorrência de DM durante o diestro na espécie canina é freqüentemente relacionado ao DMG humano. Os mecanismos citados na literatura para explicar a maior associação entre diestro e diabetes, parecem não ocorrer em todas as fêmeas no diestro. A maior produção de GH pela glândula mamária estaria mais evidente em pacientes mais idosas; da mesma forma que a questão da exposição crônica e repetida aos hormônios diabetogênicos ao longo da vida; motivo pelo qual é maior a incidência de diabetes em cadelas com idade avançada. Como somente uma pequena minoria das cadelas não castradas desenvolve diabetes durante o diestro na idade adulta ou senil, outros fatores de risco podem estar envolvidos para determinar o início do diabetes, como a predisposição genética, a insulite imunomediada, a obesidade, a alimentação desequilibrada, os distúrbios endócrinos, a pancreatite crônica, dentre outros. É menos provável que o diestro *per se* seja capaz de induzir diabetes em uma paciente saudável, e sem pré-disposição gênica, apesar de prejudicar o tratamento de pacientes diabéticas sob terapia insulínica.

Nossos resultados demonstraram que as diversas fases do ciclo estral com suas características próprias regulam a sensibilidade à insulina no tecido muscular. A ocorrência de estro e de diestro está associada a uma menor afinidade entre os receptores de insulina de alta afinidade e o hormônio, bem como menor atividade tirosina quinase. Contudo, a resposta do sistema a esta menor afinidade e atividade tirosina quinase, foi um aumento na capacidade de

ligação HR no tecido muscular. Esta maior capacidade de ligação foi capaz de manter a tolerância à glicose e evitar o surgimento de uma resistência insulínica severa. Desta forma, um dos fatores que determinariam o surgimento de uma resistência insulínica severa no diestro, seria o desequilíbrio desse mecanismo compensatório de aumento na capacidade de ligação no tecido muscular.

Este trabalho é o primeiro a avaliar o impacto do complexo hiperplasia endometrial cística – piometra, patologia característica da fase do diestro e com pico de incidência em pacientes idosas com cerca de 8 anos de idade, assim como a diabetes, sobre a sensibilidade à insulina. Na presença de piometra ficou clara a intensa resistência à insulina e intolerância à glicose promovida pelo estado inflamatório / séptico das pacientes. A maior secreção pancreática de insulina na tentativa de vencer a resistência ao hormônio e aumentar a captação de glicose pelos tecidos não é suficiente para evitar a intolerância à glicose frente ao desafio do IVGTT. Estas alterações observadas devem-se em parte a intensa redução na afinidade de ligação hormônio receptor observada nas pacientes com piometra, sendo esta redução ainda mais intensa que aquela observada durante o estro e o diestro. Entretanto, nos casos de piometra, esta menor afinidade de ligação não esteve acompanhada de aumento na capacidade de ligação do hormônio ao receptor no tecido muscular, como observado nas fases de estro e de diestro. Esta falha em compensar a menor afinidade com aumento na capacidade de ligação resulta em maior secreção pancreática de insulina para manter a homeostasia da glicose. Esta maior secreção, a longo prazo, pode resultar em exaustão das células secretoras de insulina e estabelecimento do diabetes.

Estudos com técnicas de biologia molecular poderiam complementar os resultados deste trabalho, determinando as alterações na expressão dos receptores de insulina ao longo do ciclo estral e na condição HEC-P. Também outro evento que deveria ser estudado com mais profundidade seria o mecanismo de transdução do sinal insulínico em outros tecidos nestes modelos experimentais.

No entanto, os achados desta dissertação chamam atenção e abrem um campo ainda pouco explorado na medicina veterinária; as características dos receptores de insulina e a transdução do sinal insulínico em tecidos de cães ao longo do ciclo estral e em patologias hormonais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ÁHREN, B.; PACINI, G. Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta cell function in clinical studies. **European Journal of Endocrinology**. v. 150: 97-104; 2004.

ARORA, N.; SANFORD, J.; BROWNING, G.F.; SANDY, J.R.; WRIGTH, P.J. A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**. v. 66: 1530-1536; 2006.

BAILHACHE, E.; NGUYEN, P.; KREMPF, M.; SILIART, B.; MAGOT, T.; OUGUERRAM, K. Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. **Metabolism**. v. 52 (5): 559-564; 2003.

BASSO, P.C.; BRUN, M.V.; BARCELLOS, H.H.A.; RIVIERA, F.B.; KREUTZ, L.C.; ANZILIERO, D.; MELATTI, L.; BAIRROS, M.C.; ZILIO, P.P. Validação dos critérios de sepse em cães com piometra. Anais XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária. Gramado, 25 a 28 de outubro de 2006 – CDROM.

BATISTA, M.R.; SMITH, M.S.; SNEAD, W.L.; CONNOLLY, C.C.; LACY, D.B.; MOORE, M.C. Chronic estradiol and progesterone treatment in conscious dogs: effects on insulin sensitivity and response to hypoglycemia. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. v. 289: R1064-R1073; 2005.

BEHREND, E.N. Diabetes mellitus: an update on oral hypoglycemic agents and monitoring options. **Veterinary Medicine**. October, p. 743-751, 2002.

BEISCHER, N.A.; OATS, J.N.; HENRY, O.A.; SHEEDY, M.T.; WALSTAB, J.E. Incidence and severity of gestational diabetes mellitus according to country of birth in woman living in Australia. **Diabetes**. v. 40, suppl 2: 35-38; 1991.

BÉLANGER, A.G.; HOULDC, F.; LEBELC, S.; BIRONC, S.; BROCHUC, G.; TCHERNOF, A. Omental and subcutaneous adipose tissue steroid levels in obese men. **Steroids**. v. 71(8): 674-82; 2006.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 1082 p.

BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. Interleukin-1 and glucose homeostasis: an example of the biological relevance of immune-neuroendocrine interactions. **Hormone Research**. v. 31 (1-2): 94-99; 1989.

BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; LUPPI, A.; BONATI, L.; CORRADI, A. Ultrasonography and cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 39: 136-140; 2004.

BLACKWELL, T.S.; CHRISTMAN, J.W. Sepsis and cytokines: current status. **British Journal of Anaesthesia**. v. 77: 110-117; 1996.

BOSSCHERE, H.D.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; CORYN, M. Estrogen- $\alpha$  receptor and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. **Anim. Reprod. Sci.** 70: 251-259, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing of the protein dye binding. **Anal Biochemistry**. v. 72: 248-254; 1976.

CAMPOS, M.V.; BASTOS, M.; MARTINS, T.; LEITÃO, P.; LEMOS, M.; CARVALHEIRO, M.; RUAS, A. Hiperosmolaridade diabética: Análise retrospectiva de 60 casos. **Acta Médica Portuguesa**. v.16: 13-19; 2003.

CATCHPOLE, B.; RISTIC, J.M.; FLEEMAN, L.M.; DAVISON, L.J. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? **Diabetologia**. v. 48: 1948-1956; 2005.

CHAN, S.J.; STEINER, D.F. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. **American Zoology**. v. 40, p. 213-222, 2000.

CHU, S.Y.; CALLAGAN, W.M.; KIM, S.Y.; SCHMID, C.H.; LAU, J.; ENGLAND, L.J.; DIETZ, P.M. Maternal obesity and risk of gestacional diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 30 (8): 2070-2076; 2007.

CIANNI, G.D.; SEGHERI, G.; LENCIONI, C.; CUCCURU, I.; ANICHINI, R.; BELLIS, A.D.; GHIO, A.; TESI, F.; VOLPE, L.; PRATO, S.D. Normal glucose tolerance and gestacional diabetes mellitus. What is in between? **Diabetes Care**. v. 30 (7): 1783-1788; 2007.

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* v. 39: 3-25; 1989.

CORBOULD, A.M.; BAWDEN, M.J.; LAVRANOS, T.C.; RODGERS, R.J.; JUDD, S.J. The effect of obesity on the ratio of type 3 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA to cytochrome P450 aromatase mRNA in subcutaneous abdominal and intra-abdominal adipose tissue of women. **International Journal of Obesity**. v. 26: 165-175; 2002.

CORRADA, Y.; ARIAS, D.; RODRÍGUEZ, R.; TORTORA, M.; GOBELLO, C. Combination dopamine agonist and prostaglandin agonist treatment of cystic endometrial hyperplasiapyometra complex in the bitch. **Theriogenology**. v. 66-(6-7):1557-1559, 2006.

COSTA, J.V.; DUARTE, J.S. Tecido adiposo e adipocitocinas. **Acta Medica Portuguesa**. v. 19: 251-256; 2006.

COUSINS, L. Insulin sensitivity in pregnancy. **Diabetes**. v. 40, suppl 2: 39-43; 1991.

DAS, U.N. Current advances in sepsis and septic shock with particular emphasis on the role of insulin. **Med Sci Monit**. v. 9 (8): RA181-192, 2003.

DAS, U.N. Insulin in sepsis and septic shock. **Journal of the Association of Physicians from India**. v. 51: 695-700; 2003.

De COCK, H.; DUCATELLE, R.; TILMANT, K.; SCHEPPER, J.D. Possible role for insulin-like growth factor-I in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**. 57(9): 2271-2287, 2002.

DEL REY, A.; ROGGERO, E.; RANDOLF, A.; MAHUAD, C.; MCCANN, S.; RETTORI, V.; BESEDOVSKY, H.O. IL-1 resets glucose homeostasis at central levels. **PNAS**. v. 103 (43): 16039–16044; 2006.

DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G.C.W.; NOAKES, D.E. Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. **The Veterinary Record**. v. 154: 455-457; 1999.

DOMINICI, F.P.; ARGENTINO, D.P.; MUÑOZ, M.C.; MIQUET, J.G.; SOTELO, A.I.; TURYN, D. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. **Growth Hormone & IGF Research**. v. 15: 324-336; 2005.

DOW, C. Experimental reproduction of the cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Pathology & Bacteriology**. n. 78: 267-278, 1959.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of Comparative Pathology**. v. 69: 237-250; 1959.

EINGENMANN, J.E.; EINGENMANN, R.Y.; RIJINBERK, A.; GAAG, I.; ZAPF, J.; FROESCH, E.R. Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. **Acta Endocrinologica**. v. 104: 167-176; 1983.

FARIA, P.F.; ARAÚJO, D.F.; SOTO-BLANCO, B. Glicemia em cães obesos e senis. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33 (1): 47-50; 2005.

FAVIER, R.P.; MOL, J.A.; KOOISTRA, H.S.; RIJNBERK, A. Large body size in the dog is associated with transient GH excesses at a young age. **Journal of Endocrinology**. v. 170: 479-484; 2001.

FAYER-HOSKEN, R.A.; DURHAM, D.H.; ALLEN, S.; MILLER-LIEBL, D.M.; CAUDLE, A.B. Follicular cystic ovaries and cystic endometrial hyperplasia in a bitch. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 201(1): 107-108, 1992.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 3. ed. Missouri: Saunders, 2004. 1089 p.

FERREIRA, C.R.; LOPES, M.D. Complexo hiperplasia cística endometrial/piometra em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**. n. 27, p. 36-44, 2000.

FIENI, F. Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in bitches. **Theriogenology**. v. 66 (6-7): 1550-1556; 2006.

FLEEMAN, L.M.; RAND, J.S. Management of canine diabetes. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 31, n. 5, p. 855-879, 2001.

FLEEMAN, L.M.; RAND, J.S. Tratamiento a largo plazo del perro diabético. **Waltham Focus**. v. 10 (3): 16-23; 2000.

FRANSSON, B.A.; KARLAM, E.; BERGSTROM, A. LAGERSTEDT, A.S.; PARK, J.S.; EVANS, M.A. RAGLE, C.A. C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 40(5): 391-399; 2004.

GALABOVA, G.; EGERBACHER, M.; AURICH, J.E.; LEITNER, M.; WALTER, I. Morphological changes of the endometrium epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. **Reproduction Domestic Animals**. v. 38: 415-420, 2003.

GANONG, W.F. **Review of Medical Physiology**. 22<sup>a</sup> ed. Connecticut: Lange, 2005. 912 p.

GOBELLO, C. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. **Theriogenology**. v. 66: 1560-1567; 2006.

GRECO, D.S. Diagnosis and treatment of juvenile endocrine disorders in puppies and kittens. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 31, n. 2, p. 401-407, 2001.

GRECO, D.S. Diagnosis of diabetes mellitus in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 31, n. 5, p. 844-853, 2001.

GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R. **Textbook of Endocrine Physiology**. 5<sup>th</sup> ed. New York: Oxford University Press, 2004. 431 p.

GRIMBLE, R.F. Inflammatory status and insulin resistance. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. v. 5:551-559; 2002.

GUPTILL, L.; GLICKMAN, L.; GLICKMAN, N. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records. **The Veterinary Journal**. v. 165, p. 240-247, 2003.

GUTT, M.; DAVIS, C.L.; SPITZER, S.B.; LLABRE, M.M.; KUMAR, M.; CZARNECKI, E.M.; SCHNEIDERMAN, N.; SKYLER, J.S.; MARKS, J.B. Validation of the insulin sensitivity index (ISI<sub>0,120</sub>): comparison with other measures. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 47: 177–184; 2000.

HE, J.; USUI, I.; ISHIZUKA, K.; KANATANI, Y.; HIRATANI, K.; IWATA, M.; BUKHARI, A.; HARUTA, T.; SASAOKA, T.; KOBAYASHI, M. Interleukin-1 $\beta$  inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Endocrinology**. v. 20: 114–124; 2006.

HEITMEIER, M.R.; KELLY, C.B.; ENSOR, N.J.; GIBSON, K.A.; MULLIS, K.G.; CORBETT, J.A.; MAZIASZ, T.J. Role of cyclooxygenase-2 in cytokine-induced  $\beta$ -cell dysfunction and damage by isolated rat and human islets. **The Journal of Biological Chemistry** . v. 279 (51): 53145–53151; 2004.

HESS, R.B.; KASS, P.H.; WARD, C.R. Breed distribution of dogs with diabetes mellitus admitted to a tertiary care facility. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 216, n. 9, p. 1414-1417, 2000.

HOENIG, M. Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 197, p.221-229, 2002.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**. v. 42: 275-288; 1996

IACOPINO, A.M. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. **Annals Periodontology**. v. 6 (1): 125-137; 2001.

ISHIGURO, K.; BABA, E.; TORII, R.; TAMADA, H.; KAWATE, N.; HATOYA, S.; WIJewardana, V.; KUMAGAI, D.; SUGIURA, K.; SAWADA, T.; INABA, T. Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased *Escherichia coli* adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus. **The Veterinary Journal**, v. 173: 325–332; 2007.

JAGER, J.; GRÉMEAUX, T.; CORMONT, M.; MARCHAND-BRUSTEL, Y.L.E.; TANTI, J-F. Interleukin-1 $\beta$ -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of IRS-1 expression. **Endocrinology**. First published ahead of print October 12, 2006 as doi:10.1210/en.2006-0692

JENSEN, A.L. Glycated blood proteins in canine diabetes mellitus. **Veterinary Record**. v. 137: 401-405; 1995.

JOHNSTON, V.; FRAZZINI, V.; DAVIDHEISER, S.; PRZYBYLSKI, R.J.; KLIEGMAN, R.M. Insulin receptor number and binding affinity in newborn dogs. **Pediatric Research**. v. 29 (6): 611-614; 1991.

KAIYALA, K.J.; PRIGEON, R.L.; KAHN, S.E.; WOODS, S.C.; PORTE, T.; SCHWARTEZ, M.W. Reduced  $\beta$ -cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese with a high-fat feeding. **American Journal of Physiology**. v. 277, n. 40, p. E659-E667, 1999.

KAIYALA, K.J.; PRIGEON, R.L.; KAHN, S.E.; WOODS, S.C.; SCHWARTEZ, M.W. Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. **Diabetes**. v. 49, p. 1525-1533, 2000.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.C. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. Missouri: Academic Press, 1997. 932 p.

KATZ, A.; NAMBI, S.S.; MATHER, K.; BARON, A.D.; FOLLMANN, D.A.; SULLIVAN, G.; QUON, M.J. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulina sensitivity in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 85 (7): 2402-2410; 2000.

KIM, C.; BERGER, D.K.; CHAMANY, S. Recurrence of gestacional diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 30 (5): 1314-1319; 2007.

KIM, J.A.; YEH, D.C.; VER, M.; LI, Y.; CARRANZA, A. Phosphorylation of ser24 in the pleckstrin homology domain of insulin receptor substrate-1 by mouse pelle-like kinase/interleukin-1 receptor-associated kinase: cross-talk between inflammatory signaling and insulin signaling that may contribute to insulin resistance. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280 (24): 23173–23183; 2005.

KIRWAN, J.P.; HUSTON-PRESLEY, L.; KALHAN, S.C.; CATALANO, P.M. Clinically useful estimates of insulin sensitivity during pregnancy: validation studies in women with normal glucose tolerance and gestacional diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 24 (9): 1602-1607; 2001.

KLINKENBERG, H.; SALLANDER, M.H.; HEDHAMMAR, A. Feeding, exercise and weight identified as risk factors in canine diabetes mellitus. **The Journal of Nutrition**. v. 136: 1985S-1987S; 2006.

KOGIKA, M.M.; BRANDÃO, L.P.; JERICÓ, M.M.; HAGIWARA, M.K.; SIMÕES, D.M.N.; MENDONÇA, B. Determinação das concentrações séricas de glicose e insulina de cães em choque endotóxico. **Ciência Rural**. v. 31 (5): 813-817; 2001.

KOOISTRA, H.S.; den HERTOOG, E.; OKKENS, A.C.; MOL, J.A.; RIJNBERK, A. Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mild-anoestrus in beagle bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.119: 217-222; 2000.

KOOISTRA, H.S.; OKKENS, A.C.; MOL, J.A.; Van GARDEREN, E.; KIRPENSTEIJN, J.; RIJNBERK, A. Lack of association of progestin-induced cystic endometrial hyperplasia with GH gene expression in the canine uterus. **Journal of Reproduction And Fertillty**. Suppl. v. 51: 355-61, 1997.

KROOK, L.; LARSSON, S.; ROONEY, J.R.; The interrelationship of diabetes mellitus, obesity and pyometra in the dog. **American Journal of Veterinary Research**. January, p. 120-124, 1960.

KUCHARSKI, L.C.R.; RIBEIRO, M.F.; SCHEIN, V.; DA SILVA, R.S.M.; MARQUES, M. Insulin binding sites in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 279: 118-125; 1997.

KUCHARSKI, L.C.R.; CAPP, E.; CHITTÓ, A.L.F.; TRAPP, M.; SILVA, R.S.M.; MARQUES, M. Insulin signaling: tyrosine kinase activity in the crab *Chasmagnathus granulata* gills. **Journal of Experimental Zoology**. 283: 91-94, 1999.

LAFLAME, D.P. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice**. v. 22 (2):10-15; 1997.

LEITNER, M.; AURICH, J.E.; GALABOVA, G.; AURICH, C.; WALTER, I. Lectin binding patterns in normal canine endometrium and in bitches with pyometra and cystic endometrial hyperplasia. **Histology and Histopathology**. 18: 787-795, 2003.

LOSTE, A.; MARCA, M.C. Study of the effect of total serum protein and albumin concentrations on canine fructosamine concentration. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 63: 138-141; 1999.

LOSTE, A.; MARCA, M.C. Fructosamine and glycated hemoglobin in the assesment of glycaemic control in dogs. **Veterinary Research**. v. 32: 55-62, 2001.

MAEDLER, k.; SERGEEV, P.; RIS, F.; OBERHOLZER, J.; JOLLER-JEMELKA, H.I.; SPINAS, G.A.; KAISER, N.; HALBAN, P.A.; DONATH, M.Y. Glucose-induced  $\beta$ -cell

production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **Journal of Clinical Investigation**. v. 110: 851-860; 2002.

MATTHEEUWS, D.; ROTTIERS, M.D.; KANEKO, J.J.; VERMEULEN, M.D. Diabetes mellitus in dogs: relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response. **American Journal of Veterinary Research**. v. 45: 98-103; 1984.

MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting glucose and insulina concentrations in man. **Diabetologia**. v. 28: 412-419; 1985.

McGARRY, J.D. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of tipe 2 diabetes. **Diabetes**. v. 51, p. 7-18, 2002.

McPHERSON, G.A. Analysis of radioligand binding experiments: A collection of computer programs for the IBM PC. **Journal of Pharmacological Methods**. v.14: 213-228; 1985.

MOLLER, D.; FLIER, J.S. Insulin resistance. Mechanisms, syndromes, and implications. **New England Journal of Medicine**. 3325:938, 1991.

MUNSON, P.J.; RODBARD, D. LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. **Analytical Biochemistry**. v. 107: 220-239; 1980.

NELSON, R.W. Diabete melito. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. (eds.) **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v2,. p.2085-2122.

NELSON, R.W. Disorders of the endocrine pancreas. In: NELSON R.W. and COUTO, C.G. (eds.) **Small Animal Internal Medicine**. 3. ed. St Louis: Mosby, 2003. p. 729-778.

NEUVIANS, T.P.; BERGER, M. Diabetes care in cats and dogs. **Diabetic Medicine**. v. 19, p. 77-79, 2002.

NEWSHOLME, E.A.; DIMITRIADIS, G.; Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. **Experimental Clinical Endocrinology Diabetes**. v. 109, s. 2, p. S122-S134, 2001.

NILSSON, C.; URSING, D.; TÖRN, C.; ABERG, A.; LANDIN-OLSSON, M. Presence of GAD antibodies during gestacional diabetes mellitus predicts type 1 diabetes. **Diabetes Care**. v. 30 (8): 1968-1971; 2007.

NISKANEN, M.; THRUSFIELD, M.V. Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. **The Veterinary Record**. v. 143: 493-498; 1998.

NOAKES, D.F.; DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G.C. Cystic endometrial hyperplasia/pyometra in dogs: a review of the causes and patogénesis. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supl. 57: 395-406, 2001.

OHARA-IMAIZUMI, M.; CARDOZO, A.K.; KIKUTA, T.; EIZIRIK, D.L.; NAGAMATSU, S. The cytokine interleukin-1 reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic  $\beta$ -cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279 (4): 41271-41274; 2004

OLIVEIRA, E.P.; SOUZA, M.L.A.; LIMA, M.D.A. Índice HOMA (*homeostasis model assessment*) na prática clínica: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 41 (4): 237-243; 2005.

OLIVEIRA, E.R.S.; MARQUES JUNIOR, A.P.; NEVES, M.M. Endocrinologia reprodutiva da fertilidade da cadela – revisão. **Archives of Veterinary Science**. v. 8 (1): 1-12; 2003.

OMORI, Y.; MINEI, S.; UCHIGATA, Y.; SHIMIZU, M.; SANAKA, M.; HONDA, M.; HIRATA, Y. Comparison of diagnostic criteria of IGT, borderline e GDM: blood glucose curve and IRI response. **Diabetes**. v. 40 (2); 30-34; 1991.

ORCY, R.B.; BRUM, I.; SILVA, R.S.M.; KUCHARSKI, L.C.R.; CORLETA, H.v.E.; CAPP, E. Insulin receptor tyrosine kinase activity and substrate 1 (IRS-1) expression in human myometrium and leiomyoma. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 123(1): 107-110; 2005.

PHILLIPS, P.J. Gestacional diabetes. Worth finding and actively treating. **Australian Family Physician**. v. 35 (9): 701-703; 2006.

PIROLA, L.; JOHNSTON, A.N.; Van OBBERGHEN, E. Modulation of insulin action. **Diabetologia**. v.47, p. 170-184, 2004

PÖPPL, A.G.; GONZÁLEZ, F.H.D. Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. **Acta. Scien. Veterin.** 33(1): 33-40, 2005.

PÖPPL, A.G.; MUCCILLO, M.S.; NEUWALD, E.B.; SORTICA, M.S.; CHEUICHE, S.; LAMBERTS, M.; GOMES, C. Diabetes mellitus hiperosmolar não cetósico em uma cadela com piometra – relato de caso. **Revista da Universidade Rural – Série Ciências da Vida**. v. 25 (supl.):193-194; 2005.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. Laboratory methods in histotechnology. **Armed Forces Institute of Pathology**. American Registry of Pathology, Washington, 279 p.; 1992.

RAND, J.S.; FLEEMAN, L.M.; FARROW, H.A.; APPLETON, D.J.; LEDERER, R. Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture? **The Journal of Nutrition**. v. 134: 2072S-2080S; 2004.

RENAULD, A.; GARRIDO, D. Effect of glucose infusion in dogs on blood sugar, insulinemia and serum free fatty acid responses. **Medicina (Buenos Aires)**. v. 52: 150-156; 1992.

RENAULD, A.; GOMEZ, N.V.; SCARAMAL, J.D.; GARRIDO, D.; WANKE, M.M. Natural estrous cycle in normal and diabetic bitches. Basal serum total lipids and cholesterol. Serum tryglicerides profiles during glucose and insulin tests. **Acta Physiology Pharmacology Theratogeny Latino America**. v. 48, p. 41-51, 1998.

RENAULD, A.; GOMEZ, N.V.; SCARAMAL, J.D.; GARRIDO, D.; WANKE, M.M. Serum insulin, glucose and non esterified fatty acids after administration of follicle-stimulating and luteinizing hormones in bitches. **Medicina (Buenos Aires)**. v. 63: 28-32; 2003.

RENAULD, A.; GOMEZ, N.V.; SCARAMAL, J.D.; GARRIDO, D.; WANKE, M.M. Natural estrous cycle in normal and diabetic bitches. II) serum nonesterified fatty acids and serum free glycerol levels during glucose and insulin tests. **Acta Physiology Pharmacology Theratogeny Latino America**. v. 49, p. 44-56, 1999.

RENAULD, A.; SVEDLIK, R.C. Blood sugar, serum insulin and free fatty acid levels in normal dogs. Sex differences. **Acta Physiologica Latinoamericana**. v. 25: 458-461; 1975.

RENAULD, A.; SVERDLIK, R.C.; AGÜERO, A.; PÉREZ, R.L. Influence of estrogen-progesterone sequential administration on pancreas cytology. Serum insulin and metabolic adjustments in female dogs. **Acta Diabetológica Latina**. v. 27: 315-327; 1990.

RENAULD, A.; SVERDLIK, R.C.; LAWZEWITSCH, I.V.; AGÜERO, A.; PÉREZ, R.L.; RODRÍGUEZ, R.R.; FOGLIA, V.G. Metabolic and histological pancreatic changes induced by ovariectomy in the female dog. **Acta Physiologica Pharmacologica Latinoamericana**. v. 37: 289-304; 1987.

RIJNBERK, A.; KOOISTRA, H.S.; MOL, J.A. Endocrine diseases in dogs and cats: similarities and differences with endocrine diseases in humans. **Growth Hormone and IGF Research**. v. 13, p. S158-S164, 2003.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Endocrinologia reproductiva na cadela. **Clínica Veterinária**. v. 40: 50-58; 2002.

ROSENFELD, L. Insulin: discovery and controversy. **Clinical Chemistry**. v. 48, n.12, p. 2270-2288, 2002.

RUSSELL, M.A.; CARPENTER, M.W.; COUSTAN, D.R. Screening and diagnosis of gestacional diabetes mellitus. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. v. 50 (4): 949-958; 2007.

RYAN, E.A.; ENNS, L. Role of gestacional hormones in the induction of insulin resistance. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 67:341, 1988.

SALTIEL, A.R.;KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**. v. 414, p. 799-806, 2001.

SANVITTO, G.L. *Estudo filogenético dos receptores cerebrais para insulina*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992.

SCARAMAL, J.D.; RENAULD, A.; GOMEZ, N.V.; GARRIDO, D.; WANKE, M.M.; MARQUEZ, A.G. Natural estrous cycle in normal and diabetic bitches in relation to glucose and insulin tests. **Medicina (Buenos Aires)**. v. 57: 169-180; 1997.

SCATCHARD, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 51: 660-677; 1949.

SCHULMAN, R.L. Insulin and others therapies for diabetes mellitus. **Veterinary Medicine**. p. 334-347, april, 2003.

SELMAN, P.J.; MOL, J.A.; RUTTEMAN, G.R.; RIJNBERK, A. Progestin treatment in the dog I. Effects on growth hormone, insuli-like growth factorI anf glucose homeostasis. **European Journal of Endocrinology**. v. 131, p. 413-421, 1994.

SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole. 2 vol. 2713 p. 2007.

SMITH, F.O. Canine pyometra. **Theriogenology**. v. 66: 610-612; 2006.

SOUZA, A.A.; OLIVEIRA, B.A.; BENJAMIM, S.M.Jr.; OLIVEIRA, C.R.; OLIVEIRA, F.E.; RIBEIRO, V.M. Diabete melito em cão jovem – relato de caso. **ANCLIVEPA Brasil**. N. 2, p. 50, 2004. Resumo.

SOWA, R.; SANKE, T. HIRAYAMA, H.; TABATA, H.; FURUTA, H.; NISHIMURA, S.; NANJU, H. Islet amyloid polypeptide amide causes piferal insulin resistance in vivo in dogs. **Diabetologia**. v. 33, p. 118-120, 1990.

STEER, S.A.; SCARIM, A.L.; CHAMBERS, K.T.; CORBETT, J.A. Interleukin-1 stimulates b-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1. **PLoS Medicine**. v.3 (2): 0253-266; 2006.

SYRENICZ, A.; GARANTY-BOGACKA, B.; SYRENICZ, M.; GEBALA, A.; WALCZAK, M. Low-grade systemic inflammation and the risk of type 2 diabetes in obese children and adolescents. **Neurology and Endocrinology Letters**. v. 27 (4): Epub ahead of print; 2006.

THOMPSON, F.N. Reprodução em mamíferos do sexo feminino. In: REECE, W.O. Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 644-669; 2006.

THRALL, M.A. **Veterinary Hematology and Clinical Biochemistry**. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 518 p. 2004.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**. v. 6:772-786; 2006.

TURYN, D.; SILVA, R.S.M.; MARQUES, M.; DELLACHA, J.M. Characterization of insulin-binding sites in turtlethyroid microsomes. **Journal Endocrinology**. v. 118:157-162; 1986.

Van CRUCHTEN, S.; Van den BROECK,; D'HAESELEER, M.W.; SIMOENS, P. Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. **Theriogenology**. 62: 631-641, 2004.

Van HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry*. v. 11: 256-265; 1965.

VANNUCCHI, C.I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S.E.C. Técnica de citologia vaginal como método de diagnóstico da fase do ciclo estral em cadelas. **Clínica Veterinária**. nº9: 14-19; 1997.

VARGAS, A.M.; BARROS, R.P.A.; ZAMPIERI, R.A.; OKAMOTO, M.M.; PAPA, P.C.; MACHADO, U.F. Abnormal subcellular distribution of GLUT4 protein in obese and insulin-treated diabetic female dogs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37: 1095-1101; 2004.

VERVERIDIS, H.N.; BOSCO, C.M.; STEFANAKIS, A.; SARATSI, P.; STAMOU, A.I.; KRAMBOVITIS, E. Serum estradiol-17 $\beta$ , progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. **Theriogenology**. 62: 614-623, 2004.

VIEIRA, R. Histórico do diabetes mellitus. **Home Page do Prof. Ricardo Viera**. Disponível em <<http://www.geocities.com/capecanaveral/launchpad/9071/histórico.html>>. Acesso em: 03 nov. 2004.

VOMERO, M.F. Diabete, o novo mal do século. **Super Interessante**. ed. 180, p. 42-50, 2002.

WACHLIN, G.; AUGSTEIN, P.; SCHROEDER, D.; KUTTLER, B.; KLOTTING, I.; HEINKE, P.; SCHMIDT, S. IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. **Journal of Autoimmunity**. v. 20: 303-312; 2003.

WAGNER, M.B. Aspectos básicos da sumarização de informações em medicina. **Jornal de Pediatria**. v. 74: 71-76; 1998.

WAGNER, M.B.; CALLEGARI-JACQUES, S.M. Medidas de associação em estudos epidemiológicos: risco relativo e odds ratio. **Jornal de Pediatria**. v. 74: 247-251; 1998.

WATANAKE, R.M.; BLACK, M.H.; XIANG, A.H.; ALLAYEE, H.; LAWRENCE, J.M.; BUCHANAN, T.A. **Diabetes Care**. v. 30 suppl(2): S134-S140; 2007.

WEISS, R.R.; CALOMENO, M.A.; SOUSA, R.S.; BRIERSDORF, S.M.; CALOMENO, R.A.; MURADAS, P. Avaliação histopatológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. **Archives of Veterinary Science**. v. 9 (2): 81-87; 2004.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### ANAMNESE PADRÃO PROJETO

**Paciente número** \_\_\_\_ **Grupo** \_\_\_\_ **Fase Ciclo Estral** \_\_\_\_\_  
**Proprietário:** \_\_\_\_\_ **Telefones:** \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_

Apetite: \_\_\_\_\_

Tipo Alimento: \_\_\_\_\_

Frequência refeições: \_\_\_\_\_

Micção/evacuação: \_\_\_\_\_

Cios regulares: \_\_\_\_\_

Último cio: \_\_\_\_\_

Uso de progestágenos: \_\_\_\_\_

Número de cruzas/gestações: \_\_\_\_\_

Ambiente (casa/apto): \_\_\_\_\_

Atividade diária (1-5): \_\_\_\_\_

Vacinas: \_\_\_\_\_

Vermifugação: \_\_\_\_\_

Medicações: \_\_\_\_\_

Doenças anteriores: \_\_\_\_\_

Vômitos/diarréia: \_\_\_\_\_

Secreções óculo-nasais, auricular, vaginal: \_\_\_\_\_

Tosse/espirros: \_\_\_\_\_

Tempo de evolução (piometras): \_\_\_\_\_

Doenças concomitantes: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

O que motivou a procura pela castração ? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## ANEXO 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS

### TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

#### **Avaliação da sensibilidade à insulina ao longo do ciclo estral e durante a condição hiperplasia endometrial cística – piometra.**

As Fêmeas da espécie canina apresentam um ciclo reprodutivo chamado de ciclo estral, composto basicamente de quatro fases: pro-estro (fase onde há corrimento vaginal sanguinolento e atração de machos), estro (fase onde a fêmea aceita o macho), diestro (fase lútea do ciclo onde a fêmea não aceita mais o macho, porém existe uma atividade hormonal ovariana caracterizada por um aumento na concentração do hormônio Progesterona na circulação) e o anestro (fase de descanso, onde não há atividade hormonal). Em algumas fêmeas, durante o diestro, há um crescimento exagerado do endométrio (hiperplasia endometrial cística) de forma a provocar um acúmulo de líquido dentro deste órgão, evoluindo para um acúmulo de pus em decorrência das bactérias naturalmente presentes no trato genital (piometra).

A diabetes mellitus é uma doença endócrina decorrente da deficiência de insulina para manter níveis normais de glicose no sangue. As fêmeas caninas, idosas, não castradas apresentam uma maior predisposição para desenvolver esta doença em decorrência da progesterona circulante durante o diestro. Esta progesterona promove um antagonismo à insulina, e cronicamente, pode levar ao estado diabético caso o paciente apresente predisposição a esta doença. Doenças inflamatórias, infecciosas, neoplásicas ou endócrinas podem também causar antagonismo à insulina e predispor o paciente a diabetes mellitus.

Este estudo visa avaliar a sensibilidade à insulina em cadelas em anestro, diestro ou com o complexo hiperplasia endometrial cística – piometra. Para tal os pacientes participantes do estudo que forem submetidos à castração (eletiva ou como parte do tratamento para piometra), passarão por uma bateria de avaliações composta por exames de sangue (hemograma, perfil bioquímico), teste de tolerância intravenoso à glicose, citologia vaginal e ultrassonografia; antes do procedimento cirúrgico. Durante o ato cirúrgico uma amostra de aproximadamente uma (01) grama do músculo reto-abdominal será coletada e congelada em nitrogênio líquido para posterior análise. Os proprietários interessados em participar deste projeto, e beneficiar seu animal de estimação com este exames gratuitos necessitam assinar este termo de consentimento informado, cientes de que os custos do procedimento cirúrgico não serão cobertos pelo projeto, da mesma forma que não haverá nenhum custo adicional pela participação neste estudo.

Eu \_\_\_\_\_ proprietário da paciente \_\_\_\_\_ raça \_\_\_\_\_ idade \_\_\_\_\_ ficha clínica \_\_\_\_\_ autorizo a participação do animal acima descrito neste projeto de pesquisa.

Paciente número \_\_\_\_\_

Grupo \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Proprietário

\_\_\_\_\_  
Médico Veterinário

Porto Alegre \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_