



Tratamento médico à longo prazo de neoplasia de célula beta com diazóxido

Diazoxide long term medical therapy for beta-cell neoplasia

Álan Gomes Pöppl¹, Simone Tostes de Oliveira², Cristiano Gomes³,
Marcelo de Souza Muccillo⁴ & Émerson Antônio Contesini⁵

¹Mestrando, Fisiologia, Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, ICBS/UFRGS.

²Doutoranda, Ciências Veterinárias, Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, HCV/UFRGS.

³Mestrando, Ciências Veterinárias, Laboratório de Cirurgia Experimental, HCV/UFRGS. ⁴Mestrando, Ciências Veterinárias, Laboratório de Cirurgia Experimental, HCV/UFRGS. ⁵Prof. Dr., Departamento de Medicina Animal, FaVet/UFRGS.

ABSTRACT

A 13 years old mixed breed dog was presented for monitoring and medical treatment for an insulinoma in medical therapy for over 1 year. Low dose diazoxide therapy was started obtaining good clinical control. Adverse effects was documented even so a lower than recommended dose was implemented. Life quality reduction and suddenly neoplasia growth set out for surgical therapy.

Key words: insulinoma; medical therapy, diazoxide.

INTRODUÇÃO

Neoplasias de células β pancreáticas funcionais (insulinomas) produzem insulina independente do efeito supressivo da hipoglicemia [4]. A produção e liberação autônoma de insulina, leva a contínua e acelerada utilização de glicose pelos tecidos e conseqüente hipoglicemia [2]. Sinais clínicos de neuroglicopenia podem tornar-se evidentes e normalmente são a causa da procura por atendimento [4]. O tratamento preferencial de insulinomas é cirúrgico, no entanto; a cirurgia pancreática deve ser vista com cautela em decorrência do risco de ocorrência de pancreatite no pós-operatório [1,3,5]. A presença de metástases e a própria localização do tumor pancreático primário podem ser fatores complicadores [4]. Dentre as opções de medicamentos, o diurético tiazídico diazóxido¹ inibe a secreção de insulina, estimula a gliconeogênese hepática e glicogenólise e inibe a utilização tecidual de glicose; resultando em hiperglicemia [6]. O presente relato apresenta uma descrição dos resultados obtidos no tratamento de um insulinoma utilizando o diazóxido no protocolo terapêutico. O uso desta medicação é pouco difundido em decorrência de dificuldades na obtenção da medicação e custo elevado [4]. Relatos do uso de diazóxido no tratamento de insulinomas são esporádicos [5].

RELATO DE CASO

Um canino sem raça definida cruza Dashchund x Pequinês, 13 anos de idade e 12 kg de peso corporal, foi encaminhado em julho de 2006, com histórico anterior de episódios de tontura, dificuldade de manter a postura e tremores já tendo recebido inúmeros diagnósticos errôneos entre 2004 e 2005. O uso de prednisona² (0,5 mg/kg, vo, bid) para suspeita de hérnia de disco vertebral obteve uma excelente melhora clínica. Após 3 meses quando descontinuou-se a medicação, voltaram os sinais culminando com fortes convulsões em agosto do ano de 2005, quando passou a receber fenobarbital³ (25 mg, vo, bid).

Apesar da hipoglicemia identificada na investigação inicial (30 mg/dL) a concentração de insulina sérica nesta ocasião fora inferior a 5 μ U/ml descartando temporariamente um possível insulinoma. De acordo; ecografia abdominal e videolaparoscopia falharam na identificação de uma possível tumoração pancreática. Um teste de estimulação com ACTH⁴ como diferencial para hipoadrenocorticismo teve resultados normais (cortisol basal 105,4 ng/dL; cortisol 1h pós ACTH 122,2 ng/dL). A prednisona foi mantida na mesma dose e frequência, no entanto, sem obter resposta plena.

Após um mês, documentou-se hiperinsulinemia (59,7 μ U/ml) em presença de hipoglicemia (glicemia 47 mg/dL). Iniciou-se terapia com o diazóxido (15 mg, vo, bid) após importação da medicação pelos proprietários da Alemanha. Uma farmácia de manipulação fracionou os comprimidos de 100 mg em cápsulas com concentrações distintas de diazóxido. Iniciou-se redução gradual da prednisona e do fenobarbital, mantendo-se somente o diazóxido como tratamento por um período de 3 meses. Em janeiro de 2007 um quadro anêmico grave (1,52 milhões de eritrócitos/mm³; Hb 3,4 g/dL e Ht 10%) – um dos efeitos adversos do diazóxido – exigiu além de transfusão sangüínea, uma redução na dose da medicação, obtendo-se um controle ideal (glicemia na faixa de 50 mg/dL) associando-se diazóxido (3 mg, vo, bid) a hidroclorotiazida⁵ (25 mg, vo, sid) e prednisona (5 mg, vo, bid). Mesmo após a mudança no protocolo terapêutico e normalização do hemograma, outros sinais adversos da medicação como apetite fraco / hiporexia e hipermotilidade gastro-intestinal permaneceram presentes [6].

Ao longo de 11 meses de uso do diazóxido não foi registrada nenhuma convulsão apesar de prostração, períodos prolongados de sono, consciência reduzida e andar cambaleante, especialmente após refeições e/ou caminhadas na rua, fossem achados freqüentes. O regime alimentar era composto de duas refeições diárias de ração comercial light, associado a carnes, vísceras de aves e biscoitos comerciais ao longo do dia.

Em maio de 2006 uma ultra-sonografia evidenciou em área topográfica de lobo esquerdo de pâncreas, uma área hipocogênica discretamente heterogênea, arredondada e com bordos irregulares, compatível com neoplasia pancreática.

Media cerca de 1,5 cm de diâmetro, passando a 3,0 cm após 45 dias. Foi preconizada manutenção do protocolo vigente associado a regime alimentar com dieta comercial rica em fibras dividida em seis refeições ao longo do dia. Fontes extras a ração de carboidratos foram retirados da dieta, bem como fígado e carnes com maior teor de gordura. Foi recomendada manutenção da rotina de caminhadas, no entanto evitando aumento na intensidade ou duração das atividades físicas, bem como exposição a situações estressantes.

Em agosto de 2006 em decorrência do crescimento abrupto da neoplasia e dos bons resultados nos exames de triagem, exceto glicemia 37 mg/dL (fructosamina 161 μ mol/L) optou-se por uma abordagem cirúrgica, que obteve sucesso no trans e pós-operatório imediato. Não foram observadas metástases em pâncreas, fígado, linfonodos ou demais órgãos inspecionados. O exame histopatológico do tumor evidenciou células pequenas arranjadas entre trabéculas de tecido conjuntivo, configurando um tumor pancreático de ilhotas. Houve recidiva dos sinais clínicos após sete semanas da cirurgia. Atualmente o paciente esta sob tratamento médico com análogo da somatostatina octreotida⁶.

DISCUSSÃO

Insulinomas ocorrem tipicamente em cães de grande porte de média idade a idosos [2]. A maior parte dos cães já estavam sintomáticos meses antes de serem apresentados [2]. Ganho de peso e condição corporal elevada são achados comuns em decorrência da lipogênese estimulada pela hiperinsulinemia crônica [4]. Os sintomas de neuroglicopenia (convulsões, fraqueza, colapsos, ataxia, fasciculações musculares e comportamentos bizarros) tendem a ser episódicos e de curta duração em decorrência da ativação de mecanismos compensatórios hiperglicêmicos [4]. Pacientes cronicamente hipoglicêmicos toleram glicemias da ordem de 20 a 30 mg/dL sem apresentar sinais clínicos (hipoglicemia inconsciente) [4]. Fatores como atividade física; onde a musculatura está consumindo mais glicose associado ao maior consumo de todo organismo em decorrência da hiperinsulinemia, agitação, e jejum prolongado; podem predispor a ocorrência de sinais clínicos [2]. A ingestão alimentar e conseqüente aumento na glicemia também pode causar sinais de neuroglicopenia. O aumento na glicemia pode estimular ainda mais a secreção de insulina pelo tumor [4].

A determinação de hiperinsulinemia (insulinemia > 20 μ U/ml) com glicemia inferior a 50 mg/dL praticamente confirma o diagnóstico, enquanto insulinemia inferior a 5 μ U/ml descarta a possibilidade de insulinoma [4]. A primeira tentativa de documentação da hiperinsulinemia não obteve sucesso em decorrência de problemas no armazenamento da amostra. A insulina sérica sofre degradação por uma insulinase presente dentro dos eritrócitos e o grau de hemólise determina o grau de degradação [7]. A dificuldade em visualização de uma massa pancreática é comum na ecografia, radiografia ou laparotomia exploratória. A manipulação gentil do órgão pode ajudar na identificação de um nódulo interno ao parênquima da glândula, sendo um procedimento de risco para pancreatite [1,2,5,8]. No presente relato mesmo a magnificação da imagem obtida através de videolaparoscopia não obteve sucesso em identificar o tumor. Dificuldades na identificação de micro-tumores funcionais predispoem a presença de metástases no momento do diagnóstico inicial, o que pode limitar o sucesso do tratamento [4]. No presente caso clínico a ocorrência de metástases provavelmente esteve envolvida na recidiva de sinais clínicos após 7 semanas da cirurgia.

O tratamento médico consiste basicamente da administração de dietas de absorção lenta divididas em várias pequenas refeições por dia, associado a uso de glicocorticóides como a prednisona (0,5 a 4 mg/kg/dia em 2 a 3 frações, conforme gravidade dos sinais) [2,4,8]. As interferências no metabolismo da glicose provocadas pelo diurético diazóxido causam um efeito final hiperglicêmico [6]. No entanto esta medicação não apresenta nenhum efeito anti-neoplásico e não inibe a síntese de insulina. Seu mecanismo de ação esta envolvido na inibição do aumento do cálcio intra-celular nas células β , passo fundamental ao processo de excitação celular necessário para secreção de insulina [6]. A dose inicial é de 10 mg/kg, podendo atingir até 60 mg/kg, sendo que a medicação pode ser utilizada sozinha no protocolo terapêutico, ou em adição a prednisona quando esta não esta sendo efetiva [4,6].

No presente relato, observou-se adequado controle com administração de 10 mg/animal (o que corresponde a menos de 1 mg/kg) observando-se inclusive sinais adversos da medicação como anemia aplástica e transtornos gastro-intestinais [6]. A redução na dose da medicação e associação com a hidroclorotiazida e prednisona mantiveram o controle que vinha sendo alcançado. A hidroclorotiazida aumenta o efeito hiperglicemiante do diazóxido [6]. O objetivo do tratamento é estabelecer uma dose em que a hipoglicemia e sinais clínicos sejam reduzidos ou ausentes [2,4].

CONCLUSÃO

Os insulinomas podem representar um desafio diagnóstico em determinadas situações e o uso de protocolos de tratamento alternativos podem manter um paciente bem controlado por períodos superiores aos obtidos com cirurgia. O diazóxido apesar de caro e de difícil obtenção pode representar uma alternativa terapêutica, especialmente se os sinais adversos forem toleráveis.

NOTAS INFORMATIVAS

¹Proglycem (Baker Norton, Miami, USA).

²Meticortem (Shering-Plough, São Paulo, Brasil).

³Fenocris (Cristália, São Paulo, Brasil).

⁴Synacthène (Novartis, Rueil Malmaison, France).

⁵Clorana (Sanofil/Synthél, Rio de Janeiro, Brasil).

⁶Sandostatin (Novartis, Rueil Malmaison, France).

REFERÊNCIAS

- 1 **Cox D. 1999.** Pancreatic insulin-secreting neoplasm (insulinoma) in a West Highland white terrier. *The Canadian Veterinary Journal.* 40: 343-345.
- 2 **Feldman E.C. & Nelson R.W. 2004.** *Canine and Feline Endocrinology and reproduction.* 3.ed. St. Louis: Saunders, 1089p.
- 3 **Fenton A.C. 2003.** Pancreatic insulin-secreting neoplasia in a 9-year-old Afghan hound. *The Canadian Veterinary Journal.* 44: 918-920.
- 4 **Graves T.K. 2006.** The clinical approach to hypoglicemia. In: *VIº Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais* (São Paulo: Brasil). p. 32-35.
- 5 **Leifer C.E., Peterson M.E. & Matus R.E. 1986.** Insulin-secreting tumor: Diagnosis and medical and surgical management in 55 dogs. *Journal of American Medical Association.* 188: 60-64.
- 6 **Plumb D.C. 2002.** *Veterinary Drug Handbook.* 4th edn. Ames: Iowa State Press, 960p.
- 7 **Sapin R. 2001.** Insulin assays – when and how should they be performed. *Clinical Laboratory International.* 15: 6-8.
- 8 **Vallee I.K. 2003.** Insulin-secreting beta cell neoplasia in a 10-year-old dog. *The Canadian Veterinary Journal.* 44: 592-594.





Análise cromatográfica das frações lipídicas em cães obesos e em cães com hiperadrenocorticismismo

Chromatographic analysis of lipid fractions in obese dogs and in dogs with hyperadrenocorticism

Fernanda de Camargo Chiquito¹, Tatiane Moreno Ferrarias², Kazuo Kajihara³, Márcio Antonio Bastistela Moreira⁴, Valéria Sutti Nunes⁵, Edna Regina Nakandakare⁵ & Márcia Marques Jericó⁶

¹Graduação, Universidade Anhembi Morumbi. ²Residente, Universidade Anhembi Morumbi. ³Biomédico, Universidade Anhembi Morumbi. ⁴Médico Veterinário, Universidade Anhembi Morumbi. ⁵Laboratório de Lípidos LIM 10, Faculdade de Medicina da USP. ⁶Universidade Anhembi Morumbi. E-mail: marciajerico@hotmail.com

ABSTRACT

Obesity and hyperadrenocorticism in dogs are common condition in the veterinary practice, and both present some clinical and laboratorial similarities, such as weight gain and dislipidaemias. The aim of this study was to characterize and compare plasmatic lipid fractions in control dogs (n=10), obese dogs (n=10) and in dogs with hyperadrenocorticism (n=6). Compared to the control group, the hyperadrenocorticism group we observed significant increase in total cholesterol, total triglycerides, with more accumulation in VLDL fraction and reduction in HDL fraction. Triglyceride was increment in HDL fraction. Plasma triglycerides and cholesterol were increase in obese group, compared the controls, but are reduced to hyperadrenocorticism. However, only VLDL cholesterol was diminished in obese compared to hyperadrenocorticism. There were no significant changes in LDL cholesterol and triglycerides fractions. Through this data, we may conclude that cholesterol metabolism and VLDL and HDL fractions of hyperadrenocorticism dogs are significantly different from the control group and from the obese group. These findings may be a helpful tool in the differential diagnosis of these diseases and suggest an increased risk of atherosclerotic complications.

Key words: dogs, obesity, hyperadrenocorticism, lipoproteins.

INTRODUÇÃO

Obesidade é definida como uma condição de balanço energético positivo e excesso de tecido adiposo com prejuízos vários à saúde do animal [3,5]. Numerosas causas e fatores sociais contribuem para a formação da obesidade. Esta inclui condições genéticas, sexuais, falta de exercícios, excesso de alimentação e dieta desbalanceada [8,13]. Certas condições mórbidas como o hipotireoidismo e o hiperadrenocorticismismo e determinados agentes terapêuticos como glicocorticóides, progestágenos, fenobarbitúricos e benzodiazepínicos induzem a polifagia e resultam em ganho de peso [14]. Dentre estas, o hiperadrenocorticismismo de origem endógena obriga a uma abordagem diagnóstica precisa, dada a sua alta prevalência na espécie e às suas repercussões negativas na economia animal, incluindo as dislipidemias [10,12]. Lipoproteínas são classificadas em diferentes categorias de acordo com combinações diferenciadas de lipídios e de proteínas. Em cães, quatro principais classes de lipoproteínas são bem definidas: quilomicrons, que é uma lipoproteína exógena, e três classes de lipoproteínas endógenas, VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade) [6]. A separação das lipoproteínas pode ser realizada por métodos diversos e dependem do tamanho e forma, carga elétrica e densidade [4]. O presente trabalho tem o objetivo de caracterizar as frações de lipoproteínas plasmáticas em cães obesos e cães portadores de hiperadrenocorticismismo, comparando-os com cães normais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram estudados 26 cães sendo selecionados 10 cães para o grupo controle 10 cães para o grupo de obesos e 6 cães para o grupo com hiperadrenocorticismismo no Hospital Veterinário Anhembi Morumbi. Para definir o grupo de obesos foram realizados testes de escore da condição corporal (ECC) e determinação de porcentagem de gordura corporal (%GC>20%), além de ausência de sintomas óbvios de endocrinopatias ou de uso de medicamentos que promovessem o ganho de peso. O diagnóstico de hiperadrenocorticismismo foi possível através da sintomatologia, dos exames laboratoriais de rotina e do teste de supressão com dexametasona (cortisol basal e 8h após dexta – 0,01mg/kg/IV) As lipoproteínas dos plasmas foram separadas por cromatografia líquida em filtração, em gel de alta resolução, no sistema FPLC Pharmacia com coluna de Superose 6, HR 10/30 composta de grânulos de agarose *cross-linked* de 11 - 15 mm. Foram aplicados 200 mL de plasma na coluna sob um fluxo constante de 0,5 mL/min de tampão Tris (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM e Na₂S₂O₃ 0,03%), pH 7,0 [40,71] e 60 frações de 0,5 mL foram coletadas em um coletor de frações. Nas frações de nº 11 até nº 40 foi dosado colesterol e triglicérides pelo método enzimático em analisador automático bioquímico Cobas Mira (F. Hoffmann-La Roche, Basileia, Suíça) para determinação do perfil do colesterol e triglicérides das lipoproteínas e identificação dos picos das frações VLDL, LDL e HDL [9].

Análise estatística: Foram comparados a média e desvio padrão dos parâmetros analisados e comparados pelo teste One way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$) pelo meio do software Prisma 4 for Windows, Graph Pad Software, Inc. EUA.

RESULTADOS

O grupo controle são cães normais de diversas raças, com idade entre dois a dez anos, sendo cinco machos e cinco fêmeas. O grupo de obesos são cães de diversas raças com idade variadas entre dois a doze anos, sendo quatro machos e seis fêmeas. O grupo com hiperadrenocorticismo são cães também de diversas raças com idade entre seis a doze anos, sendo um macho e cinco fêmeas.

O grupo controle apresenta colesterol plasmático total 193 ± 44 mg/dL, e a distribuição percentual nas frações foram: VLDL-COL 2,345%, LDL-COL 15,79%, HDL-COL 81,86%, os triglicérides plasmáticos totais 50 ± 15 mg/dL, e suas frações VLDL-TG 39,17%, LDL-TG 35,9%, HDL-TG 24,94%. O grupo de obesos possui colesterol plasmático total 240 ± 63 mg/dL, e a distribuição percentual nas frações foram: VLDL-COL 3,983%, LDL-COL 21,21%, HDL-COL 74,81%, os triglicérides plasmáticos totais 93 ± 52 mg/dL e suas frações VLDL-TG 59,79%, LDL-TG 26,62%, HDL-TG 13,68%. O grupo com hiperadrenocorticismo apresenta colesterol plasmático total 348 ± 105 mg/dL, e a distribuição percentual nas frações foram: VLDL-COL 15,11%, LDL-COL 28,63%, HDL-COL 56,26%, os triglicérides plasmáticos totais 300 ± 227 mg/dL, e suas frações VLDL-TG 64,07%, LDL-TG 29,65%, HDL-TG 6,231%.

A concentração do colesterol e triglicérides totais do grupo com hiperadrenocorticismo foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle e obeso ($p < 0,01$), e o grupo de obesos foi maior em relação ao grupo controle. Quanto ao perfil das lipoproteínas, a fração de VLDL colesterol do grupo de obesos foi menor que do grupo com hiperadrenocorticismo ($p < 0,01$). Quando comparado ao grupo controle, o grupo com hiperadrenocorticismo apresentou maior porcentagem de VLDL colesterol ($p < 0,001$), e menor porcentagem de colesterol e de triglicérides na fração de HDL ($p < 0,01$).

DISCUSSÃO

O termo hiperlipidemia é usado na prática clínica para a definição do aumento da concentração de colesterol e, ou triglicérides em amostras de sangue de animais em jejum alimentar de 12 horas [15]. Hiperlipidemia primária é rara em cães, mas é reconhecida como uma condição familiar em schnauzer miniatura. Mais comumente, pode ser secundária ao hipotireoidismo, ao diabetes melitus, à síndrome nefrótica e ao hiperadrenocorticismo [1]. Geralmente as hiperlipidemias estão associadas a vários problemas clínicos, incluindo pancreatite, alterações gastrointestinais, lipidose hepática e aterosclerose [15].

No presente trabalho observamos que ocorreu no grupo de cães obesos um aumento de colesterol total na fração VLDL, que em cães é uma fração pequena de lipoproteína, mas muita rica em triglicérides [8,11], e no grupo de cães com hiperadrenocorticismo observamos um aumento de colesterol [7] nas frações de VLDL e uma diminuição da fração HDL colesterol e de triglicérides, contrariando em um estudo anterior um significado aumento na fração LDL colesterol [2].

Em todas as raças de cães, HDL é o principal transporte de colesterol na circulação, em comparação LDL colesterol em cães é baixa [16]. Em nosso estudo não houve aumento e nem diminuição significativa em LDL.

CONCLUSÃO

Concluiu-se, nos grupos ora estudados, que os cães com hiperadrenocorticismo diferem significativamente dos cães normais e dos obesos no que tange ao metabolismo do colesterol e de suas frações VLDL e HDL, o que auxilia no diagnóstico diferencial destas morbidades e sugere maior risco para complicações ateroscleróticas

REFERÊNCIAS

- 1 **Barrie J., Nash A. S., Watson T.D.G. 1993.** Quantitative analysis of canine plasma lipoproteins. *Journal of Small Animal Practice* 34, 226 – 231.
- 2 **Barrie J., Watson T.D.G., Stear M.J., Nash A.S. 1993.** Plasma cholesterol and lipoprotein concentrations in the dog: The effects of age, breed, gender and endocrine disease. *Journal of Small Animal Practice* 34, 507 – 512.
- 3 **Burkholder W.J. & Toll P.W. 2000.** Obesity. In: Hands, M.S.; TatcheR, C.D.; Remmiliard, R.L.; Roudebusch, P. *Small Animal Clinical Nutrition*. 4.ed. Topeka, Mark Mooris Institute, p.401-430.
- 4 **Catazoni S. 2003.** Restrição alimentar crônica em cloreto de sódio induz depósito de lipídios no arco aórtico e aumento da concentração de lipídios no plasma de camundongos com ablação gênica para receptor de LDL. 92f. São Paulo, SP. Dissertação (Doutorado em Ciências Biomédicas) – ICB/USP
- 5 **Colliard L., Ancel J, Benet J., Paragon B., and Blanchard G. 2006.** Risk factors for obesity in dogs in France. *Journal Nutrition*. 136:1951-1954.
- 6 **Ford R.B. 1993.** Idiopathic hyperchylomicronaemia in miniature schnauzers. *Journal of Small Animal Practice*. 34, 488-492.
- 7 **Huang H. H., Yang H., Liang S., Lien Y., Chen K. 1999.** Iatrogenic Hyperadrenocorticoidism in 28 Dogs. *Journal of American Animal Hospital Association* 35:200-7.
- 8 **Jeusette I.C., Lhoest E.T., Istasse L.P., Diez M.O. 2005.** Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentration in dogs. *American Journal Veterinary Research*. 1: 81-6.
- 9 **Kieft K.A., Bocan T.M.A. & Krause B.R. 1991.** Rapid on-line determination of cholesterol distribution among plasma lipoproteins after high-performance gel filtration chromatography. *Journal Lipid Research*. 32: 859-866.

- 10 **Larry P. Tilley, Francis W.K. Smith Jr.** 2003. Consulta Veterinária em 5 minutos espécie canina e felina. 2º Ed. Barueri: Manole, 810-811.
- 11 **Maldonado E.N., Romero J. R., Ochoa B., Aveldaño M.** 2001. Lipid and fatty acid composition of canine lipoproteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128, 719 – 729.
- 12 **Rosen M., Cedars M. I.,** 2006. *Endocrinologia Básica e Clínica.* 7º Ed. - Rio de Janeiro: Mc Graw Hill. 437p
- 13 **Reusch, C** 2005. Hyperadrenocorticism. In: Ettiiger, S.J., Feldman, E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6.ed.; St. Elsevier Saunders, Louis Missouri, p. 1592-1621.
- 14 **Sloth C.** 1992. Practical management of obesity in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 33, 178-182.
- 15 **Watson T. D. & Barrie J.** 1993. Lipoprotein metabolism and hyperlipidaemia in the dog and cat: A review. *Journal of Small Animal Practice* 34, 479 – 487.
- 16 **Wright-Rodgers A. S., Waldron M. K., Bigley K. E., Lees G. E., Bauer J. E.** 2005. Dietary Fatty Acids Alter Plasma Lipids and Lipoprotein Distributions in Dogs during Gestation, Lactation, and the Perinatal Period. *Journal Nutrition.* 135:2230 – 2235.





Estudo preliminar da ligação hormônio-receptor da insulina à membranas de músculo e da tolerância à glicose em fêmeas caninas durante o ciclo estral

Hormone-receptor binding preliminary evaluation from insulin to muscles membranes and glucose tolerance in female dogs during oestrus cycle

Álan Gomes Pöppl¹, Tatiane da Silva Mottin², Cinthia Brum Dias², Irene Breitsmater³, Carlos Afonso de Castro Beck⁴, Camila Lasta⁵, Félix Hilário Díaz González⁶, Luiz Carlos Kucharski⁷ & Roselis Silveira Martins da Silva⁷

¹Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada-ICBS/UFRGS. ²Graduação, FAVET/UFRGS. ³Médica Veterinária, Técnica Contratada, HCV/UFRGS. ⁴Setor de Medicina Animal, FAVET/UFRGS. ⁵Residente (R2) em Patologia Clínica, Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, HCV/UFRGS. ⁶Setor de Patologia Animal, FAVET/UFRGS. ⁷Biólogo(a), Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS (Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada).

ABSTRACT

The major predisposition to diabetes mellitus development by diestral bitches is being associated to progesterone induced mamary production of GH. This work evaluate binding profile between insulina and insulin receptor em bitches during oestrus cycle.

Key words: bitches, oestrus cycle, glucose tolerance, insulin receptor.

INTRODUÇÃO

A cadela é uma espécie poliéstrica anual, apresentando tipicamente um ciclo estral a cada 7 meses, com intervalos inter-estrais de 4 a 13 meses em decorrência de variações individuais, sazonais e raciais. A concentração de progesterona (P4) de cadelas em anestro é basal (< 0,5 ng/ml), permanecendo com valores menores que 1 ng/ml durante o pró-estro. No início do estro a concentração sérica da P4 começa a elevar-se, tipicamente mantendo-se maior que 2 ng/ml. A concentração de P4 continua aumentando durante o estro e as primeiras semanas do diestro, seguido de um platô que normalmente é superior a 40ng/ml (15 – 90 ng/ml). O fim desta fase é marcado pelo retorno da concentração sérica de P4 a valores basais e repouso do eixo hipotálamo-hipófise-ovário [2]. Evidências apontaram um efeito antagonico direto à insulina pela P4, reduzindo a ligação de insulina e transporte de glicose nos tecidos alvos [7]. A liberação de GH pela gândula mamária induzida pela P4 é um fenômeno bem documentado em cadelas [3,10]. Clinicamente observa-se uma maior prevalência de desenvolvimento de diabetes mellitus (DM) em cadelas em diestro [2,5]. O objetivo deste trabalho foi avaliar os perfis de ligação entra a insulina e seus receptores em amostras de músculo de cadelas durante o ciclo estral, bem como a tolerância à glicose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta e duas pacientes encaminhadas para ovário-salpingo-histerectomia (OSH) eletiva pelo Projeto de Controle Reprodutivo de Cães e Gatos do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS participaram do estudo. Com base no histórico reprodutivo e citologia vaginal as pacientes foram divididas em 3 grupos: anestro (n = 11, idade média 1,51 anos ± 1,02), estro (n = 7, idade média 2,48 anos ± 2,01) e diestro (n = 14, idade média 5,13 anos ± 3,68). Critérios de inclusão como ausência de leucocitose, adequada condição corporal, não uso de progestágenos e ausência de doenças intercorrentes foram adotados. De cada paciente avaliou-se hemograma; plaquetometria; fibrinogênio plasmático; colesterol total e triglicerídeos séricos (kits diagnósticos¹); citologia vaginal e ultra-sonografia abdominal.

No pré-operatório, foi realizado um teste intra-venoso de tolerância à glicose (IVGTT) com determinação de glicemia nos tempos 0, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 minutos de IVGTT [4]. Para determinação da glicemia foi utilizado um glucômetro portátil². O protocolo anestésico foi padronizado para ambos grupos com ampicilina sódica (22 mg/kg, IV), meperidina (3 mg/kg, IM), propofol (5 mg/kg, IV) e manutenção com isoflurano em oxigênio à 100%. Após OSH coletou-se 2 gramas de músculo retro-abdominal de cada paciente; imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até análise posterior.

As membranas de músculo foram preparadas homogeneizando o músculo em tampão TES (Tris 10mM, EDTA 1mM, Sacarose 250mM) pH 7,4 (1:5 P/V) e isoladas por centrifugação fracionada sob refrigeração. Os ensaios de ligação foram realizados oferecendo-se 400 µg de proteína por tubo em tampão Krebs-Ringer mamífero (KRM) pH 7,4 com albumina sérica bovina (BSA) a 1% na presença de concentrações crescentes de insulina regular humana³ (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml) mais 20000 cpm de insulina-¹²⁵I humana⁴ ou somente na presença de insulina marcada (ligação total). Após 2 horas de incubação a 25°C, o conteúdo dos tubos foi filtrado (filtro Whatman⁵). Cada filtro foi lavado 5 vezes com 1 ml de KRM 0,1% BSA. Depois de secos foi medida, em contador LKB, a formação do complexo insulina-¹²⁵I

humana/receptor. O tratamento estatístico foi feito com ANOVA de uma via seguida de Teste de Tukey, considerou-se significativo valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

O peso médio do grupo anestro foi $14,31 \text{ kg} \pm 6,5$ (condição corporal $2,92 \pm 0,47$), enquanto o grupo estro apresentou peso médio $16,75 \text{ kg} \pm 9,8$ (condição corporal $3,09 \pm 0,33$) e o grupo diestro $17,35 \text{ kg} \pm 9,87$ (condição corporal $3,05 \pm 0,44$). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos com relação a: leucometria, fibrinogênio plasmático, colesterol total, triglicerídeos séricos, glicemia basal e glicemia nos tempos de IVGTT estudados.

Não foi observada diferença significativa na ligação total entre os grupos anestro ($1372,2 \text{ cpm} \pm 500,1$); estro ($903,3 \text{ cpm} \pm 135$) e diestro ($1469,8 \text{ cpm} \pm 500,2$). A redução percentual a partir da ligação total (100%) em presença de concentrações crescentes de insulina regular humana foi 70,1% no grupo anestro; 94,7% no grupo estro e 90,1% no grupo diestro na presença de $0,1 \mu\text{g/ml}$ de insulina. Na presença de $1 \mu\text{g/ml}$ de insulina regular, os valores foram: anestro 69,6%; estro 78,1% e diestro 83,3%. Em presença de $10 \mu\text{g/ml}$ o percentual passou para 59,4% no grupo anestro; 66,3% no grupo estro e 78,5% no grupo diestro. Com $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de insulina os valores foram: anestro 55,9%; estro 68,5% e diestro 63,8%. Enquanto o grupo anestro apresentou valores de ligação 47,9% da ligação total, os grupos estro e diestro apresentaram respectivamente 64,9% e 61,3% com insulina regular na dose de $250 \mu\text{g/ml}$ ao ensaio. Enfim, na presença de $500 \mu\text{g/ml}$ o grupo anestro evidenciou uma ligação de 48,7% da ligação total e os grupos estro e diestro 64,3% e 52,4% respectivamente.

Os valores de ligação na presença de $0,1 \mu\text{g/ml}$ de insulina regular foram diferentes entre os grupos estro e diestro ($p < 0,001$) em comparação ao grupo anestro. Da mesma forma, observou-se diferença significativa na presença de $250 \mu\text{g/ml}$ de insulina não marcada ($p = 0,003$). Nas concentrações de $1 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$ e $500 \mu\text{g/ml}$ não observou-se diferenças significativas entre os grupos, apesar dos valores respectivos de $p = 0,071$, $p = 0,073$, $p = 0,361$ e $p = 0,069$.

DISCUSSÃO

Um estudo verificou prevalência de 79% de fêmeas com diagnóstico recente na fase do diestro [5]. Muitas vezes o início do estro pode ser um fator de risco a cetoadicose em pacientes diabéticas com pobre controle, persistindo a resistência insulínica ao longo do diestro [2,5,8]. Entretanto, não foi demonstrada evidencia de diferenças significativas entre valores de glicemia, tolerância à glicose e concentrações de insulina em cadelas em anestro, estro ou diestro [8]. Porém em cadelas diabéticas não castradas, fica clara a supressão de secreção de insulina nas fases de estro; e principalmente no diestro em comparação as diabéticas em anestro [8]. Até o momento este estudo apresentou resultados similares com relação à tolerância à glicose. A avaliação futura da insulinemia nos tempos de IVGTT poderá vir de encontro a esta observação.

São raros os estudos avaliando a relação primária da P4 com a sensibilidade à insulina [2,7]. Além de efeitos autócrinos e parácrinos na mama, o GH mamário pode apresentar um importante efeito endócrino; resultando em resistência insulínica e eventualmente sinais de acromegalia [2,3]. Observou-se maior secreção basal de GH e menor secreção em pulsos de GH durante platôs de P4 plasmática. Acredita-se que esta mudança possa ser decorrente da supressão parcial da liberação de GH pela hipófise em uma retroalimentação negativa do GH mamário [4]. O GH é um hormônio antagonista à insulina e um importante modulador da sensibilidade à insulina [1]. A hiperinsulinemia característica de quadros de excesso de GH resulta em redução da concentração de receptores de insulina e prejuízo de sua atividade tirosina-quinase [1]. Um estudo não demonstrou alterações significativas ao longo do ciclo estral em cadelas controle no colesterol total e triglicerídeos, ao contrário do observado em pacientes diabéticas não castradas [6]. O mesmo foi demonstrado até o momento neste estudo e em outros trabalhos do nosso grupo.

Os resultados dos ensaios de ligação hormônio-receptor evidenciam diferentes padrões de ligação insulina-receptor. A análise dos resultados com o programa de Scatchard permitirá a determinação da concentração dos receptores de insulina por μg de proteína de membrana bem como a determinação da constante de dissociação hormônio-receptor [9]. Amostras de membranas estão sendo armazenadas a -80°C para avaliação da atividade tirosina-quinase do receptor de insulina em cada grupo. Também será determinada a concentração de glicogênio muscular.

CONCLUSÃO

Estes resultados evidenciam um padrão diferente de interação da insulina com seus receptores de alta e baixa afinidade em cadelas em estro e diestro em comparação com cadelas em anestro. O estudo dos receptores de insulina em tecidos alvo pode ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos na maior predisposição à diabetes em cadelas em diestro.

NOTAS INFORMATIVAS

¹Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil.

²Accu-Check Active, Roche Diagnóstica, Jacarepaguá, Brasil.

³ ^3I -[¹²⁵I] iodotyrosyl A ¹⁴¹ insulin, human recombinant, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido.

⁴Biohulin R, Biobrás, Montes Claros, Brasil.

⁵GF/B, Whatman, Maidstone, Inglaterra.

REFERÊNCIAS

- 1 **Dominici F.P., Argentino D.P., Muñoz M.C., Miquet J.G., Sotelo A.I., Turyn D. 2005.** Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Hormone & IGF Research*. 15: 324-336
- 2 **Feldman E.C. & Nelson R.W. 2004.** *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3.ed. Missouri: Saunders, 1089p.
- 3 **Kooistra H.S., den Hertog E., Okkens A.C., Mol J.A., Rijnberk A. 2000.** Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anestrus in beagle bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*. 119: 217-222.
- 4 **Mattheeuws D., Rottiers M.D., Kaneko J.J. & Vermeulen M.D. 1984.** Diabetes mellitus in dogs: relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response. *American Journal of Veterinary Research*. 45: 98-103.
- 5 **Pöpl A.G., González F.H.D. 2005.** Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33: 33-40.
- 6 **Renauld A., Gomez N.V., Scaramal J.D., Garrido D., Wanke M.M. 1998.** Natural estrous cycle in normal and diabetic bitches. Basal serum total lipids and cholesterol. Serum tryglicerides profiles during glucose and insulin tests. *Acta Physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latino Americana*. 48: 41-51.
- 7 **Ryan E.A., Enns L. 1988.** Role of gestacional hormones in the induction of insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 67: 341-348.
- 8 **Scaramal J.D., Renauld A., Gomez N.V., Garrido D., Wanke M.M., Marquez A.G. 1997.** Natural estrous cycle in normal and diabetic bitches in relation to glucose and insulin tests. *Medicina (Buenos Aires)*. 57:169-80.
- 9 **Scatchard G. 1949.**The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 51: 660-677.
- 10 **Selman P.J., Mol J.A., Rutteman G.R. & Rijnberk A. 1994.** Progestin treatment in the dog I. Effects on growth hormone, insuli-like growth factor-I and glucose homeostasis. *European Journal of Endocrinology*. 131: 413-421.





Influência do complexo hiperplasia endometrial cística – piometra na sensibilidade periférica à insulina e predisposição à diabetes mellitus: resultados preliminares

Endometrial cystic hiperplasia – pyometra complex influences in periferic insulin sensibility and diabetes mellitus predisposition: preliminary results

Álan Gomes Pöppl¹, Fernando Espinosa Souza², Karine da Silva Neves², Carlos Afonso de Castro Beck³, Juliano de Souza Leal⁴, David Driemeier⁵, Camila Serina Lasta⁶, Félix Hilário Díaz González⁵, Sandra Costa Valle⁷, Luiz Carlos Kucharski⁸ & Roselis Silveira Martins da Silva⁸

¹Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada-ICBS/UFRGS. ²Graduação, FAVET/UFRGS (Bolsista CNPq). ³Departamento de Medicina Animal, FAVET/UFRGS. ⁴Mestrando em Patologia Veterinária, Setor de Patologia Veterinária, FAVET/UFRGS. ⁵Departamento de Patologia Animal, FAVET/UFRGS. ⁶Residente (R2) em Patologia Clínica, Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, HCV/UFRGS. ⁷Nutricionista, Doutoranda, Ciências Fisiológicas, Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada. ⁸Biólogo (a), Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS, Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada.

ABSTRACT

Cystic endometrial hyperplasia – pyometra (HEC-P) represents an hormone-mediated condition with a strong inflammatory and septic component. Many reports point to positive relationship among inflammatory status, sepsis and insulin resistance. Glucose tolerance, lipidic profile, hormone-receptor binding profile and others aspects were compared between anestral bitches and bitches with HEC-P.

Key words: bitches, pyometra, glucose tolerance, insulin receptor.

INTRODUÇÃO

A imunoendocrinologia evidenciou uma série de correlações entre o processo inflamatório e os efeitos da insulina [1,3,4]. A IL-1 reduz a ligação e a fusão de grânulos secretores de insulina em células β pancreáticas, com decréscimo preferencial da primeira fase de exocitose; característica da fase pré-diabética no *Diabetes mellitus* (DM) tipo I [7]. Também foi demonstrado o papel da IL-1 na morte celular de células β pancreáticas [10]. Com relação aos eventos pós-receptor, ocorre inibição da fosforilação do IRS-1 e associação com o fosfatidilinositol 3-quinase em resposta a IL-1a. [4].

Os mediadores da resposta inflamatória (TNF- α , IL-1 e IL-6) iniciam mudanças metabólicas (hiperlipidemia e ativação da gliconeogênese) no organismo para prover nutrientes para o sistema imune [3]. No sistema nervoso central a IL-1 reduz o ponto de ajuste da glicemia, favorecendo a captação de glicose pelas células imunes durante a resposta inflamatória [1]. A piometra é uma condição inflamatória e infecciosa hormônio-mediada, limitante a vida em alguns casos, quando não tratada [8]. A exposição crônica e prolongada à progesterona em cadelas intactas é um fator de risco ao desenvolvimento do complexo hiperplasia endometrial cística-piometra (HEC-P) [2]. As elevadas concentrações de progesterona e de GH mamário durante o diestro são importantes fatores envolvidos na maior predisposição ao desenvolvimento de diabetes mellitus em cadelas em diestro [4]. O GH mamário pode causar alterações hiperplásicas no endométrio [4]. O objetivo deste trabalho é avaliar a sensibilidade à insulina em cadelas com hiperplasia endometrial cística – piometra.

MATERIAIS E MÉTODOS

Onze cadelas em anestro (idade média 1,51 anos \pm 1,02) encaminhadas para ovário-salpingo-histerectomia (OSH) eletiva, e 15 cadelas (idade média 6,83 \pm 2,78) encaminhadas para OSH como parte do tratamento para HEC-P no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS; foram selecionadas respeitando critérios de inclusão e exclusão.

De cada paciente foram avaliados: a citologia vaginal, o hemograma; e concentrações plasmáticas de fibrinogênio, de triglicérides e de colesterol (kits diagnósticos¹). No pré-operatório, foi realizado um teste intra-venoso de tolerância à glicose (IVGTT) com determinação de glicemia nos tempos 0, 3, 5, 7, 15, 30, 45 e 60 minutos de IVGTT [6]. Para determinação da glicemia foi utilizado um glucometro portátil². O protocolo anestésico foi padronizado, para ambos os grupos, com ampicilina sódica (22 mg/kg, IV), meperidina (3 mg/kg, IM), propofol (5 mg/kg, IV) e manutenção com isoflurano em oxigênio à 100%. Após OSH coletou-se 2 gramas de músculo reto-abdominal de cada paciente; imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos permaneceram congelados a -80°C até posterior estudo de ligação hormônio-receptor. Amostras do útero foram armazenadas em formol a 10% para análise histopatológica.

As membranas de músculo foram preparadas homogeneizando o músculo em tampão TES (Tris 10mM, EDTA 1mM, Sacarose 250mM) pH 7,4 (1:5 P/V) e isoladas por centrifugação fracionada sob refrigeração. Os ensaios de ligação foram realizados oferecendo-se 400 μ g de proteína por tubo em tampão Krebs-Ringer mamífero (KRM) pH 7,4 com albumina sérica bovina (BSA) a 1% na presença de concentrações crescentes de insulina regular humana³ (0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml,

100 µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml) mais 20000 cpm de insulina-I¹²⁵ humana⁴ ou somente na presença de insulina marcada (ligação total). Após 2 horas de incubação a 25°C, o conteúdo dos tubos foi filtrado (filtro Whatman⁵). Cada filtro foi lavado 5 vezes com 1 ml de KRM 0,1% BSA. Depois de secos foi medida, em contador LKB, a formação do complexo insulina-I¹²⁵ humana/receptor. O tratamento estatístico foi feito com ANOVA de uma via seguida de Teste de Tukey, considerou-se significativo valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

O peso médio do grupo anestro (An) foi 14,3 kg \pm 6,5 (condição corporal 2,92 \pm 0,47), enquanto o grupo HEC-P teve peso médio de 27,1 kg \pm 11,5 (condição corporal 2,88 \pm 0,56). Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nos leucócitos totais (An 10,3 $\times 10^3$ milhões/mm³ \pm 2,6; HEC-P 29,7 $\times 10^3$ milhões/mm³ \pm 20,7) e no fibrinogênio plasmático (An 2,36 g/L \pm 0,8; HEC-P 3,6 g/L \pm 1,7). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos triglicerídeos séricos (An 66,4 mg/dL \pm 23,2; HEC-P 105,8 mg/dL \pm 45,3) e no colesterol total sérico (An 140,7 mg/dL \pm 23,4; HEC-P 181,2 mg/dL \pm 92,9). A glicemia basal não variou ($p > 0,05$) entre os grupos anestro (89,1 mg/dL \pm 10,9) e HEC-P (83,4 mg/dL \pm 10,8) nem nos tempos 3 (An 270,1 mg/dL \pm 64,9; HEC-P 264,5 mg/dL \pm 70,8), 5 (An 235,8 mg/dL \pm 39,3; HEC-P 245 mg/dL \pm 51,7), 7 (An 206 mg/dL \pm 35; HEC-P 209,5 mg/dL \pm 56,1) e 15 minutos (An 165,8 mg/dL \pm 32,1; HEC-P 195,1 mg/dL \pm 50,7). Contudo, nos tempos 30 (An 104,8 mg/dL \pm 29; HEC-P 159,3 mg/dL \pm 54,1), 45 (An 86,8 mg/dL \pm 14,1; HEC-P 129,9 mg/dL \pm 44,6) e 60 minutos de IVGTT (An 91,5 mg/dL \pm 12; HEC-P 122,4 mg/dL \pm 38,3), observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na glicemia do grupo HEC-P em comparação ao grupo anestro.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a ligação total em ambos grupos (An 1372 cpm \pm 500; HEC-P 1177 cpm \pm 250). A redução percentual a partir da ligação total (100%) em presença de concentrações crescentes de insulina regular humana no grupo anestro foi de 70% (0,1 µg/ml); 70% (1 µg/ml); 59% (10 µg/ml); 56% (100 µg/ml); 48% (250 µg/ml) e 49% (500 µg/ml). No grupo HEC-P a redução percentual a partir da ligação total foi 94% (0,1 µg/ml); 74% (1 µg/ml); 68% (10 µg/ml); 61% (100 µg/ml); 51% (250 µg/ml) e 54% (500 µg/ml). O percentual de redução observado da ligação total na presença de 0,1 µg/ml de insulina regular humana foi significativamente diferente ($p < 0,001$) entre os grupos.

DISCUSSÃO

Os valores elevados de leucometria total e de fibrinogênio evidenciam o estado inflamatório do grupo HEC-P, o que pode estar relacionado à intolerância à glicose detectada no presente estudo [2,4,7,10]. A determinação futura da insulinemia e avaliação funcional dos receptores de insulina no presente estudo, permitirão averiguar a presença e característica da resistência insulínica. A avaliação histopatológica das amostras uterinas do grupo HEC-P permitirá a divisão em dois sub-grupos: hiperplasia endometrial cística isolada e piometra. Esta divisão poderá explicar as diferentes magnitudes de resposta inflamatória observadas no grupo HEC-P (leucócitos totais entre 18 $\times 10^3$ milhões/mm³ e 96 $\times 10^3$ milhões/mm³). Algumas pacientes com HEC-P em excelente condição pré-operatória e com valores de leucócitos totais pouco elevados; apresentaram respostas ao IVGTT idênticas a respostas de cadelas controle. A avaliação histopatológica de úteros de algumas destas pacientes evidenciou a presença isolada de hiperplasia endometrial cística. Apesar de piometras graves não apresentarem valores de colesterol e triglicerídeos significativamente diferentes daqueles do grupo controle; os maiores valores (406 mg/dL) foram observados em pacientes com piometras graves [3]. Da mesma forma, observou-se correlação positiva entre grau de risco anestésico e maior magnitude de intolerância à glicose no IVGTT [3,4,7]. Entretanto, algumas pacientes com piometra grave apresentaram elevação de pequena magnitude na glicemia (156 mg/dL) durante a fase inicial do IVGTT. O desvio de glicose para o sistema imunológico pode explicar estes resultados em alguns casos [1].

A menor inibição da ligação total em presença de insulina regular na concentração de 0,1 µg/ml observada no grupo HEC-P pode evidenciar um perfil diferente de ligação entre a insulina e seus receptores de alta e baixa afinidade em membranas musculares. A análise destes dados com o programa de Scatchard permitirá a determinação da concentração dos receptores de insulina por µg de proteína de membrana bem como a determinação da constante de dissociação hormônio-receptor [10]. A análise posterior da atividade tirosina-quinase do receptor de insulina permitirá a avaliação da repercussão de um evento inflamatório/infeccioso no primeiro passo intra-celular na cascata de sinalização da insulina [4]. A importância de eventos relacionados ao receptor de insulina ou eventos pós-receptor no desenvolvimento da *Diabetes mellitus* canina ainda são pouco conhecidos [2]. A intolerância à glicose apresentada pelas pacientes com HEC-P pode ser o evento desencadeante do estado diabético nessas cadelas.

CONCLUSÃO

O complexo HEC-P representa um fator de risco ao desenvolvimento de *Diabetes mellitus* em cadelas predispostas. Novos experimentos e análises permitirão esclarecer de forma mais clara os mecanismos envolvidos nesta interação imun-endócrina.

NOTAS INFORMATIVAS

¹Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil.

²Accu-Check Active, Roche Diagnóstica, Jacarepaguá, Brasil.

³3-[¹²⁵I] iodotyrosyl A ¹⁴¹ insulin, human recombinant, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido.

⁴Biohulin R, Biobrás, Montes Claros, Brasil.

⁵GF/B, Whatman, Maidstone, Inglaterra.

REFERÊNCIAS

- 1 **Del Rey A., Roggero E., Randolf A., Mahuad C., McCann S., Rettori V., Besedovsky H.O. 2006.** IL-1 resets glucose homeostasis at central levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*.103: 16039–16044.
- 2 **Feldman E.C. & Nelson R.W. 2004.** *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3.ed. Missouri: Saunders, 1089p.
- 3 **Grimble R.F. 2002.** Inflammatory status and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 5: 551-559.
- 4 **He J., Usui I., Ishizuka K., Kanatani Y., Hiratani K., Iwata M., Bukhari A., Haruta T., Sasaoka T., Kobayashi M. 2006.** Interleukin-1 β inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology*. 20:114-124.
- 5 **Kooistra H.S., den Hertog E., Okkens A.C., Mol J.A., Rijnberk A. 2000.** Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anoestrus in beagle bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*. 119: 217–222.
- 6 **Mattheeuws D., Rottiers M.D., Kaneko J.J. & Vermeulen M.D. 1984.** Diabetes mellitus in dogs: relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response. *American Journal of Veterinary Research*. 45: 98-103.
- 7 **Ohara-Imaizumi M., Cardozo A.K., Kikuta T., Eizirik D.L., Nagamatsu S. 2004.** The Cytokine Interleukin-1 α reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic β -cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 41271–41274.
- 8 **Scatchard G. 1949.**The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 51: 660-677.
- 9 **Smith F.O. 2006.** Canine pyometra. *Theriogenology*. 66: 610–612.
- 10 **Steer S.A., Scarim A.L., Chambers K.T., Corbett J.A. 2005.** Interleukin-1 stimulates b-cell necrosis and release of the immunological adjuvant hmgb1. *PLoS Medicine*. 3:253-266.

