UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Estudos clínicos sobre os fatores de risco e a resistência à insulina na diabetes mellitus em cães

Álan Gomes Pöppl

PORTO ALEGRE
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Estudos clínicos sobre os fatores de risco e a resistência à insulina na diabetes mellitus em cães

Autor: Álan Gomes Pöppl

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal

Orientador: Félix Hilário Díaz González

PORTO ALEGRE
2012

CIP - Catalogação na Publicação

Pöppl, Álan Gomes
Estudos clínicos sobre os fatores de risco e a resistência à insulina na diabetes mellitus em cães / Álan Gomes Pöppl. -- 2012.
214 f.

Orientador: Félix H. Díaz González.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. predisposição à diabetes. 2. estratégias de prevenção contra diabetes. 3. questionários. 4. remissão diabetes. 5. epidemiologia. I. H. Díaz González, Félix, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Álan Gomes Pöppl

ESTUDOS CLÍNICOS SOBRE A RESISTÊNCIA À INSULINA E PREDISPOSIÇÃO A DIABETES MELLITUS EM CÃES

Aprovada em 20 de Dezembro de 2012

APROVADO POR:

_____

Prof. Dr. Félix Hilário Díaz González (Orientador - UFRGS)

_____

Prof. Dr. Mauro Jose Lahm Cardoso (UENP)

_____

Profa. Dra. Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti (UFSM)

_____

Profa. Dra. Fernanda Vieira Amorim da Costa (UFRGS)

Este trabalho é dedicado a todos os cães que participaram dos estudos aqui descritos, e em especial para os pacientes que não pude atender durante o período de realização desta Tese.

AGRADECIMENTOS

Parar ao fim de tudo. Pensar nos agradecimentos a se fazer. Definitivamente não é uma tarefa simples, e faltam palavras para expressar alguns agradecimentos que não poderia deixar de fazer. Praticamente 13 anos depois de passar no vestibular, chegar ao fim de um período de quatro anos de estudo e trabalho intenso, na casa onde me tornei veterinário, é sem dúvida um momento de grande alegria e satisfação. Mesmo frente a cobranças diversas, seja particulares, de mestres, de clientes ou de familiares, a vontade de ir adiante jamais ofuscou os objetivos traçados. Neste sentido, agradeço a meu, posso dizer amigo e orientador, Félix H. D. González, por ter me aceito para seleção num momento importante para mim, e ter me dado a chance de passar na mesma e tocar este trabalho adiante. Pela confiança em me deixar responsável pela idealização e execução do projeto, além das demais oportunidades acadêmicas e profissionais que me proporcionou não só neste período, pois a parceria é antiga, desde os tempos da graduação quando aceitou me orientar com um trabalho para o Prêmio Waltham 2003, e de lá para cá, hoje temos aqui uma Tese de doutorado. Obrigado Félix!

A minha família, outro agradecimento especial! Sem o apoio e suporte familiar não tenho dúvida de que as dificuldades para chegar a este momento seriam muito maiores! Obrigado também pela paciência e compreensão em entender a ausência física, o pensamento distante, as fugas necessárias eventualmente da realidade, e pelo suporte e base para enfrentar tudo isso com hombridade, tranquilidade e sabedoria. Mãe, Mano, Prima e Tio, Avôs e Vó *in memoriam*, porém não ausentes, o meu obrigado por tudo! Pai, Mano e Mana, Tio, e Vó que por falta de tempo pouco convivermos, e que acabam não presenciando de perto tudo isso que foi minha vida nestes últimos anos, o meu muito obrigado por toda vibração positiva que vem de vocês nos poucos momentos que conseguimos estar juntos!

Os últimos 18 meses desta Tese foram talvez os mais duros desta longa jornada, porém acompanhados da mais doce companhia que eu poderia precisar. Alguém que conheci na hora certa, no dia certo, mas num lugar improvável, e que trouxe de volta o equilíbrio que eu precisava para finalizar este trabalho! Amore, obrigado por todo apoio mútuo que nós temos em todos os sentidos, sabemos que

vamos longe e eu sei quão importante tu foi para eu chegar até hoje como estou chegando!

Aos animais e a Deus não se agradece. Não precisa. Este agradecimento é superior a palavras e transcende qualquer digitação. A forma como agradeço aos animais, e a Energia que tudo rege, é retribuir da melhor forma possível e sempre! Da mesma forma, à minha querida e espero não saudosa UFRGS, meu maior agradecimento espero que possa ser ainda levar o teu nome pelos quatro cantos do mundo com os conhecimentos que aqui adquiri e desenvolvi. Não posso deixar também de agradecer ao CNPq, meu provedor e sem o qual talvez este trabalho não pudesse ter sido realizado. Espero sinceramente que possamos manter fortes elos acadêmicos por muitos anos ainda.

Porém Agradecimentos se fazem a pessoas, e poderia dar nomes a várias, mas são diferentes grupos de pessoas com que tenho o grande prazer de conviver no trabalho ou fora dele, e que sem dúvida, cada uma a sua forma, contribuiu para que hoje eu conclua uma Tese. Agradeço do fundo do coração a todos os Amigos que participaram destes anos de pós-graduação até aqui, amigos do LACVet, amigos do HCV, amigos do futebol, amigos e Mestres da fisiologia, amigos da faculdade, amigos de infância, muito obrigado por todos os momentos de reflexão, descontração, diversão e belezas mil.

Por fim, a três corajosos alunos da Faculdade de Veterinária, gostaria de dedicar um enorme muito obrigado. A hoje M.V. Bruna Meyer, ao em poucos dias M.V. Guilherme Carvalho de Carvalho, e à em alguns anos M.V. Itatiele Faria Vivian obrigado por embarcarem junto neste projeto, por acreditarem nele, e terem ajudado a torna-lo realidade!

"*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

"I sometimes think that the question of what causes type 2 diabetes might be one of the most frequently asked and least satisfactorily answered in the history of diabetes research"

J. Denis McGarry, 2001

RESUMO

A diabetes mellitus canina (DMC) é uma doença multifatorial e de crescente incidência nas últimas décadas. Apesar do quadro diabético no cão estar associado à perda da capacidade de secreção de insulina para manutenção da glicemia, alguns mecanismos associados a esta perda de função ainda não são bem conhecidos. Acredita-se que o processo possa estar envolvido com exaustão de células beta secundário a hiperglicemia crônica, especialmente nos casos onde há antagonismos hormonais presentes, ou quando fatores de risco ambientais parecem estar envolvidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar em uma população de cães diabéticos atendidos entre 2004 e 2011, através de diferentes desenhos de estudos retrospectivos, qual o papel que diferentes fatores de risco (FR) ao desenvolvimento de DMC tiveram nestes casos, incluindo-se também uma revisão bibliográfica sobre as inter-relações entre ciclo estral e DMC. Em um estudo retrospectivo inicial em busca de casos de remissão de diabetes secundário a resolução de condições relacionadas à progesterona, foi caracterizada seis pacientes em remissão após castração, sendo que em três delas o fator progesterona-dependente presente foi piometra, e nos outros três casos os fatores foram diestro, gestação e síndrome do ovário remanescente.

O segundo trabalho buscou a criação de um questionário (QSTo) para avaliação da exposição à diferentes FR, ou de proteção, ao desenvolvimento de DMC, bem como a sobrevida (*SV*) destes pacientes após o diagnóstico. O QSTo foi aplicado em donos de 110 cães com DMC diagnosticados entre 2004 e 2011, não incluindo cães com Cushing ou hipotireoidismo. A sensibilidade (*SE*), especificidade (*ESP*) e *Kappa* (*K*), das respostas foram determinadas comparando-as com prontuários médicos padronizados das primeiras consultas. Obteve-se concordância média por questão de 95% (65 a 100%), todas com $K > 0.81$ ($p \leq 0{,}001$), exceto para as questões que avaliaram histórico de sobrepeso (0.57) e diestro (0,38), com concordância média por QSTo de 92% (72 a 100%), *SE* média 86,1% (44 - 100%), e *ESP* média 98,1% (93 - 100%). Na aplicação do QSTo, 58 pacientes (53%) já haviam morrido, sendo que 5 (4,5%) viveram poucos dias (1 a 5), e outros 6 (6,6%) viveram 1 a 3 semanas após o diagnóstico, com uma *SV* média de 24,4 (1 a 120) e moda 3 meses para os demais. A média de *SV* dos pacientes vivos na aplicação do QSTo foi de 31,8 meses (11 a 96). Assumiu-se o QSTo como boa ferramenta na avaliação da exposição à FR para DMC,

sendo diestro e sobrepeso mais sujeitos a vieses nas respostas. Na análise de *SV* fica claro que as primeiras semanas após diagnóstico são mais críticas.

No terceiro trabalho, foi realizado um estudo caso-controle, incluindo os mesmos 110 casos, e um grupo controle de 136 animais pareados por raça, sexo, idade e local de atendimentos. Após aplicação do QSTo em ambos grupos, as respostas foram dicotomizadas para avaliar exposição ou não-exposição ao FR em estudo com a criação de 2 modelos estatísticos. 1) ModMF: machos e fêmeas sem incluir FR relacionados ao ciclo estral. 2) ModF: só fêmeas (81 casos e 104 controles) com todos os FR em estudo. Após análise de regressão logística univariada condicional (RLUC) para selecionar FR potenciais associados à DMC, ofereceu-se aos modelos multivariados (MMV) as variáveis com um valor de $p < 0,20$, construídos com seleção *forward* das variáveis de menor critério de informação Akaike na RLUC, seguida de eliminação *backward* das com valor de $p \geq 0,05$. No ModMF dieta desbalanceada (OR 4,85 - IC 95% 2,2-10,7), e sobrepeso (OR 3,5 – IC 95% 1,6-7,5), foram associadas ($p \leq 0,01$) à DMC. No ModF foram associados à DMC ($p < 0,04$) diestro (OR 5,5 IC 95% 1,9-16,3), *table scraps* (OR 3,6 IC95% 1,1-12,3), dieta desbalanceada (OR 4,1 IC95% 1,9-12,7) e sobrepeso (OR 3,9 IC95% 1,2-12,6). Os resultados permitem criação de estratégias de prevenção ao apontar para nutrição, sobrepeso e diestro como FR importantes à DMC.

Por fim, um último trabalho relatando um relato de caso de descompensação de diabetes em decorrência de doença periodontal ativa é apresentado. O conjunto de resultados aqui apresentados permite a criação de estratégias de prevenção contra DMC, bem como de melhor controle dos pacientes em tratamento, ao apontar fatores de risco como inflamação, sepse, diestro, alimentação desequilibrada e sobrepeso como importantes fatores de risco associados à doença, apesar de que em muias destas situações os mecanismos não estarem elucidados.

Palavras-chave: diabetes mellitus canina, fatores de risco, epidemiologia, dieta, sobrepeso, progesterona.

ABSTRACT

Canine diabetes mellitus (CDM) is a multifactorial disease with a crescent incidence in the last decades. Despite diabetic state in the dog is associated with loss of insulin secretion ability for controlling glucose homeostasis, some mechanisms associated with this beta cell loss of function are still unknown. It is believed that some process may be associated with beta cell exhaustion secondary to chronic hyperglycemia, especially in those cases where hormonal imbalances or environmental risk factors seems to be involved. The aim of this work was evaluate in a diabetic dog population attended between 2004 and 2011, by means of different retrospective studies designs, which role different risk factors (RF) to CDM development may have played in those cases. A bibliographic review on interactions between estrus cycle and CDM was also included. An initial retrospective study searching for CDM remission cases secondary to resolution of progesterone-related conditions.

In the second paper we create a questionnaire (QSTe) to evaluate exposition to different RF, or protection factors, against CDM development, as well as survival (SV) of those patients after diagnosis. The QSTe was applied to owners of 110 diabetic dogs diagnosed between 2004 and 2011, not including cushing´s or hypothyroid dogs. The sensibility (SE), specificity (SPE) and Kappa (K) for the answers were determined by comparing them with standardized medical records from the first veterinary visit. The mean concordance by question was 95% (65 to 100%), all of them with $K > 0.81$ ($p \leq 0,001$), except for overweight (0.57) and diestrus (0.38) questions, with a 92% mean concordance for questionnaire (72 to 100%), mean SE of 86.1% (44 to 100%), and mean SPE of 98.1% (93 to 100%). When the QSTe was applied, 58 patients (53%) were already dead. From those, 5 (4.5%) lived only few days (1 to 5), and other 6 (6.6%) lived only 1 to 3 weeks after CDM diagnosis, with a mean SV of 24.4 (1 to 120) and mode 3 mo to the other ones. The mean SV time for those patients alive at the time QSTe was applied was of 31.8 (11 to 96) mos. We assumed the QSTe was a good tool for evaluation to exposition to RF for CDM. By the way, diestrus and overweight were more prone to biases in the answers. In the SV analysis, it became clear that the first weeks after diagnosis were more critical for the patient.

In the third paper it was preformed a matched case-control study, including the same 110 CDM cases, and a control group made of 136 non-diabetic dogs matched by breed, sex, age and local where the dog was first saw. After answered the QSTe by all

owners from both groups, the answers were dichotomized in order to evaluate exposition, or non-exposition to the RF in study, followed by the creation of two statistical models. 1) ModMF: males and females without inclusion of RF related to estrus cycle. 2) ModF: just females (81 cases and 104 controls) with all RF in study. After a conditional univariate logistic regression analysis (CULR) to select potential RF associated with CDM, were offered to the multivariate models (MVM) only those variables with a P-value < 0.2. The MVMs were built by forward selection step-by-step of the variables with lowest AIC (Akaike information criterion) at the CULR, followed of step-by-step backward elimination of variables with P-value ≥ 0.05. In the ModMF, unbalanced diet (OR 4.85 – 95%CI 2.2 – 10.7) and overweight (OR 3.5 – 95%CI 1.6 – 7.5) were associated (P ≤ 0.01) to CDM. In the ModF the following variables were associated with CDM (P < 0.04): diestrus (OR 5.5 – 95%CI 1.9 – 16.3), table scraps (OR 3.6 – 95%CI 1.1 – 12.3), unbalanced diet (OR 4.1 – 95%CI 1.9 – 12.7) and overweight (OR 3.9 – 95%CI 1.2 – 12.6). Those results allow creation of preventive strategies against CDM once are pointing out nutrition, overweight and diestrus as important RF associated to the disease.

At the end, one last paper reporting a case report of CDM discompensation secondary to an active periodontal disease is presented. The conjunction of evidences pointed out here allow the creation of preventive strategies against CDM development, as well as strategies for better control of patients already diabetic, once RF as inflammation, sepsis, diestrus, unbalanced diet and overweight were pointed out as important RF associated with insulin resistance, despite the fact the in some of those situations, the mechanism behind overt CDM are not completely understood.

***Key-words**: canine diabetes mellitus, risk factors, epidemiology, diet, overweight, progesterone.*

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	porcento
±	mais ou menos
≥	maior ou igual
μmol	micromol
<	menor
>	maior
Ach	acetilcolina
ADP	adenosica di-fosfato
AGL	ácido graxo livre
ALT	alanina aminotransferase
Akt	quinase serina / treonina
APS	proteína adaptadora com domínio PH e SH
ATP	adenosina tri-fosfato
BAD	proteína proaptótica da família Bcl-2
Ca^{++}	Cálcio
Cbl	protooncogene Cbl
CCK	Colecistoquinina
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CHGM	concentração de hemoglobina globular média
COMPESQ	Comissão de Pesquisa
cPL	lipase pancreática canina
dL	Decilitro
DLA	*Dog Leucocyte Antigen*
DM	diabetes mellitus
DMC	diabetes mellitus canino
DMG	diabetes mellitus gestacional
DMID	diabetes mellitus insulino-dependente
DMNID	diabetes mellitus não insulino-dependente
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ER	receptor de estrógeno
et al	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FA	fosfatase alcalina
FSH	hormônio folículo estimulante
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	hora
H^{+}	hidrogênio
HbA1c	hemoglobina A1c
HEC	hiperplasia endometrial cística
HEC-P	hiperplasia endometrial cística – piometra
IA	antígeno insulinoma

IDD	diabetes insulino-dependente
II	índice insulionogênico
IL	interleucina
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina - 1
IR	receptor de insulina
IRD	diabetes insulino-resistente
IRS	substrato ao receptor de insulina
K^+	potássio
kg	kilograma
LADA	diabetes autoimune latente do adulto
LH	hormônio luteinizante
MAPK	proteina quinase ativadora de mitose
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
mg	miligrama
mL	mililitro
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NADH	dinucleotideo adenina dicotinamida
NADPH	dinucleotideo adenina dicotinamida fosfato
NPH	neutral protamine Hagedorn
ºC	grau Celsius
OR	*odds ratio*
p.ex.	por exemplo
PEPCK	fosfoenol piruvato carboxiquinase
PGE_2	prostaglandina E_2
PI3K	fosfatidil inositol trifosfato
PIG	polipeptideo inibidor gástrico
PKB	proteína quinase B
PR	receptor de progesterona
SAS	*Statistical Analisys System*
Ser	serina
SH2	domínio homólogo a Src-2
SHP-2	domínio SH2 contendo inositol-5-fosfatase
SRD	sem raça definida
STAT	proteína ativadora de trancrição e transdução do sinal
TLI	tripsinogênio imunorreativo
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TSH	hormônio estimulador da tireoide
Tyr	tirosina
U	unidade
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VGM	volume globular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**
2 OBJETIVOS **17**
2.1 Objetivo Geral 17
2.2 Objetivos Específicos 17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **18**
3.1 Fisiologia da Insulina 18
3.1.1. Síntese 18
3.1.2. Secreção 18
3.1.3. Mecanismos de ação 19
3.2 Diabetes Mellitus Canina 21
3.2.1 Classificação e etiopatogênia 21
3.2.2 Papel do sobrepeso e de fatores dietéticos 26
3.2.3 Papel do ciclo estral 29
3.2.4 Papel da doença periodontal 32
3.2.5 Fisiopatogenia da diabetes 36
3.2.6 Epidemiologia 37
3.2.7 Manifestações clínicas 38
3.2.8 Diagnóstico 40
3.2.9 Exames complementares 40
3.2.10 Tratamento 43
3.2.11 Ajustes iniciais na terapia insulínica 52
3.2.12 Métodos para o monitoramento do controle do paciente 53
3.2.13 Complicações da terapia insulínica 59
3.2.15 Complicações crônicas da DMC 65
3.2.16 Prognóstico 69
3.2.17 Perspectivas futuras 69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **70**
4.1 Artigo 1 71
4.2. Artigo 2 103
4.3 Manuscrito 3 116
4.4 Manuscrito 4 147
4.5 Manuscrito 5 167
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS **188**
REFERÊNCIAS ADICIONAIS **192**
APÊNDICE II **211**

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a diabetes mellitus canino (DMC) é uma doença endócrina bastante freqüente nas rotinas clínicas, sendo uma das endocrinopatias mais comuns em cães. O estado diabético causa transtornos aos tutores e animais devido à poliúria e polidipsia característica da doença, além da perda de visão decorrente de catarata, risco de cetoacidose diabética e predisposição a infecções (FELDMAN & NELSON, 2004). Os gastos com um paciente diabético com relação ao diagnóstico, 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. Além disso, muitos clientes mostram-se bastante preocupados com o impacto que o diagnóstico de diabetes causa na qualidade de vida do cão, e em suas próprias vidas (APTEKMANN & SCHWARTZ, 2011, NIESSEN *et al.*, 2012a). Apesar disto, para os tutores, a experiência de tratar um cão diabético estreita a relação tutor-animal, uma vez que o tutor passa a ver o cão como um próximo (ROCK & BABINEC, 2008).

Diferentes estudos retrospectivos realizados em países desenvolvidos evidenciaram alguns fatores de risco para desenvolvimento de diabetes (idade, sexo, raça, diestro), porém um estudo de caso-controle, com 20 casos, evidenciou que dieta, excesso de peso e falta de exercícios foram mais frequentes em cães diabéticos (KLINKENBERG *et al*., 2006). Desta forma um estudo de caso-controle com maior número de casos, poderá explorar alguns fatores de risco como obesidade, tipo de dieta e periodontite. Da mesma forma, a determinação de fatores de proteção contra o desenvolvimento da DMC pode ajudar a definir um perfil diabetogênico para os cães.

Apesar de a periodontite ser considerada uma condição predisponente a diabetes em humanos e de prejudicar o tratamento de pacientes diabéticos (MEALEY, 2006), somente dois relatos de casos foram encontrados na literatura veterinária demonstrando que a periodontite afeta o controle glicêmico de cães diabéticos (Van NICE, 2006; PÖPPL *et al*., 2009). Além disso, não foi identificado nenhum trabalho de pesquisa que tenha comparado a sensibilidade à insulina em cães não diabéticos, com e sem periodontite.

Diversos fatores estão envolvidos na etiopatogênese da DMC, sendo considerada uma doença multifatorial. Predisposição genética, insulite imunomediada, pancreatite, obesidade, doenças ou drogas antagônicas à insulina (hiperadrenocorticismo, acromegalia, glicocorticóides, progestágenos, insuficiência renal, doença cardíaca, hiperlipidemia e síndrome metabólica) tem sido implicados como fatores desencadeadores de DMC (RAND *et al.,* 2004; FELDMAN & NELSON, 2004). A rota final destes diferentes fatores é a perda de função das células beta, hipoinsulinemia e hiperglicemia. A perda de função de células beta em cães com DMID é irreversível, havendo necessidade de insulinoterapia para o resto da vida na grande maioria dos casos (SCHULMAN, 2003).

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 conhecimento dos veterinários (hipótese suportada pela redução na mortalidade destes pacientes de 37% para 5% no mesmo período), mas também devido à maior prevalência de obesidade nos animais, alimentação desequilibrada, estresse e sedentarismo (GUPTILL *et al*., 2002; NEUVIANS & BERGER, 2002; RAND *et al*., 2004; CATCHPOLE *et al*., 2005; KLINKENBERG *et al*., 2006). O estilo de vida moderno acaba predispondo ao ganho de peso e sedentarismo, importantes fatores de risco associados ao desenvolvimento de diabetes em humanos. Klinkenberg *et al*. (2006) demonstraram que cães diabéticos foram menos expostos a atividades físicas intensas do que cães controles, o que pode indicar a prática de exercícios como um fator de proteção ao desenvolvimento de diabetes na espécie canina.

Contudo, a existência da diabetes mellitus tipo II como é caracterizada na espécie felina e humana, não é documentada na espécie canina, apesar de que muitos fatores de risco recentemente descritos em cães acenam para uma possível interação entre estes fatores e o desenvolvimento da DMC nos seus diferentes subtipos (RAND *et al*., 2004; WEJDMARK *et al*., 2011; VERKEST *et al*., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Através de diferentes designs de estudos clínico-epidemiológicos, ou estudo de casos clínicos, avaliar diferentes fatores de risco e proteção ao desenvolvimento da doença, e assim definir estratégias de prevenção ao desenvolvimento de diabetes mellitus em cães, baseado no estado-da-arte do conhecimento sobre o tema, bem como reforçar orientações para clientes e veterinários que favoreçam o tratamento de pacientes já diabéticos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as variáveis independentes: alimentação com dieta desequilibrada e rica em petiscos, obesidade, periodontite e ciclo estral, como fatores de risco para o desenvolvimento de DMC.
- Avaliar as variáveis independentes: atividade física frequente, manutenção saúde oral, castração precoce de fêmeas e alimentação estritamente a base de ração comercial, como fatores de proteção contra o desenvolvimento de DMC.
- Criar e validar um questionário (APÊNDICE I) para avaliação das diferentes variáveis independentes que estão sendo consideradas como fatores de risco ou proteção ao desenvolvimento de DMC para realização de entrevistas telefônicas em um estudo de caso-controle.
- Determinar a razão de chances (odds ratio) da exposição aos fatores de risco ou proteção entre pacientes diabéticos e não diabéticos pareados por raça, idade, sexo e local de atendimento.
- Determinar em um modelo de regressão logística multivariado como as diferentes variáveis em estudo se comportam e quais os principais fatores de risco ou proteção associados à DMC
- Buscar na série de casos clínicos de DMC atendidos, evidências clínicas que suportem as hipóteses levantadas nos estudos, bem como avaliar perfil da população acometida pela doença e sua sobrevida após diagnóstico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fisiologia da Insulina

3.1.1. Síntese

A insulina é sintetizada nas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas 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 peptídio de 23 aminoácidos que é removido logo na entrada do retículo endoplasmático das células β 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 dissulfito originando a pró-insulina com cerca de 9.000 daltons. O peptído que conecta as cadeias A e B facilita a alteração conformacional da molécula de pró-insulina, e é denominado peptídio-C, presente em concentrações eqüimolares nos grânulos secretórios após a ação de duas proteases que geram então a insulina biologicamente ativa (5.508 daltons) separada do peptídio-C (GANONG, 2005).

3.1.2. Secreção

A secreção de insulina pelas células β pancreáticas é estimulada rapidamente após aumentos na concentração plasmática de glicose. A glicose entra nas células β via um transportador do tipo GLUT-2. A oxidação subseqüente da glicose, após a fosforilação da molécula pela enzima glicoquinase, 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 β. 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 através da interação entre uma GPTase (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 (outros glicídeos, alguns aminoácidos, cetoácidos, AGLs, K^+, Ca^{++}, glucagon, peptídeo 1 semelhante ao glucagon, PIG – polipeptídeo inibitório gástrico, secretina, CCK, atividade vagal, Ach, atividade β-adrenérgica, sulfoniluréias e meglitininas) assim como de inibi-la (jejum, exercício, somatostatina, galanina, pancreastatina, leptina, IL-1, atividade α-adrenérgica, PGE_2 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).

3.1.3. Mecanismos de ação

O receptor de insulina (IR) é uma molécula heterotetramérica composta de 2 subunidades glicoproteicas α, responsáveis pela interação com a insulina, e duas subunidades glicoproteicas trans-membrana β, 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 α e β atuam como enzimas alostéricas, onde a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β. Quando a insulina interage com a subunidade α, causa um desbloqueio da atividade tirosina quinase da subunidade β, 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 locação 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. A seguir a fosforilação da tirosina, estas proteínas interagem com moléculas sinalizadoras através 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 PEPCK, assim como controle de padrões de expressão gênicas (PIROLA *et al.*, 2004; DOMINICI *et al.*, 2005).

A quinase serina/threonina (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, incluíndo 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 β (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 efetor 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 esta 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).

3.2 Diabetes Mellitus Canina

3.2.1 Classificação e etiopatogênia

A DMC é uma doença crônica sistêmica decorrente de uma deficiência relativa ou absoluta de insulina. A doença é classificada de diferentes formas (SCHULMAN, 2003). A primeira é baseada na classificação em humanos (tipo I ou juvenil e tipo II ou senil) e considera mecanismos patofisiológicos e alterações patológicas das células β 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 a DM em dependente de insulina (DMID) ou

DM não dependente de insulina (DMNID) (GUPTILL *et al*., 2002). Catchpole *et al*. (2005), classificam o diabetes basicamente em IDD (*Insulin-deficient diabetes*) ou IRD (*Insulin-resistance diabetes*), o que parece ser mais adequado dado os diferentes subtipos de diabetes identificados no cão. A IDD é caracterizada pelos casos onde há deficiente produção de insulina decorrente de aplasia ou hipotrofia de células β, perda de massa de células β secundária a doença pancreática exócrina (p.ex. pancreatite, atrofia) ou autoimunidade. Já a IRD é caracterizada pelos casos de diabetes secundária a antagonismo as ações da insulina provocada por outros hormônios, como nos casos de DMC secundários à diestro, gestação, acromegalia, hiperadrenocorticismo, obesidade ou iatrogênico pelo uso de glicocorticoides ou progestinas sintéticas.

A DM tipo I é caracterizada por uma combinação de suscetibilidade genética e destruição imunomediada das células β, com progressiva e muitas vezes completa deficiência de insulina (FELDMAN & NELSON, 2004). Auto-anticorpos são formados contra a insulina sérica, células β e outros componentes das ilhotas pancreáticas; como a enzima glutamato descarboxilase (GAD), e estes 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 é dividida em seis estágios, começando pela suscetibilidade genética, e passando pela ocorrência de um evento que desencadeia a autoimunidade contra as células β. Acredita-se que em cães a DM progrida de forma semelhante, mas infelizmente não é identificado antes dos estágios finais, quando a terapia insulínica é fundamental (FELDMAN & NELSON, 2004). Uma vez descompensadas, e na presença de hipoinsulinemia, as células β não são mais capazes de recuperação (HOENIG, 2002).

A DM tipo II ocorre por uma resistência periférica à insulina e por disfunção das células β (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 em humanos. Fatores ambientais como a obesidade, podem acentuar o problema. A resistência hepática à insulina é potencialmente induzida por aumento nas concentrações séricas de ácidos graxos livres na circulação portal, 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 na DM tipo II. Os pacientes acometidos por esta forma da doença não dependem de insulina para controlar a doença (NELSON, 2004). 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 β. Alguns cães e gatos obesos são identificados com resistência à insulina associado à reduzida secreção do hormônio (HOENIG, 2002). Contudo, a existência da diabetes mellitus tipo II como é caracterizada na espécie felina e humana, não é documentada na espécie canina (RAND *et al*., 2004).

No entanto, Praticamente todos os cães apresentam DMID no momento do diagnóstico (NELSON, 2004). Em cães este tipo é caracterizado por hipoinsulinemia acompanhada de: nenhum aumento nas concentrações séricas de insulina e/ou peptídeo C após administração de um secretagogo como a glicose, ou glucagon (HOENIG, 2002; FALL *et al*., 2008a), total falha no controle glicêmico somente com dietas apropriadas e agentes hipoglicemiantes (BEHREND, 2002) e total necessidade de insulina para manutenção da glicemia (SCHULMAN, 2003). Diversos fatores estão envolvidos na etiopatogênese da 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). Diferentes estudos evidenciam perfis diferentes de raças mais afetadas por diabetes, e apesar de que estas distribuições podem ser afetadas por preferências locais, algumas raças são consideradas predispostas ao desenvolvimento de diabetes, ao passo que outras são consideradas protegidas (HESS *et al*., 2000b; GUPTILL *et al.*, 2002; FRACASSI *et al*., 2004; FALL *et al*., 2007). Segundo Fleeman & Rand (2001) a descoberta recente de que cerca de 50% dos cães diabéticos apresentam anticorpos contra células β, ou contra antígenos de células β (GAD-65, IA-2) suporta a existência de uma auto-imunidade humoral (SHORT *et al*., 2009), além de outros autores evidenciarem presença de auto-anticorpos anti-insulina e anti-componentes das ilhotas em cães naturalmente diabéticos (DAVISON *et al*., 2003; DAVISON *et al*., 2008a; DAVISON *et al*., 2008b), o que reforça a associação da DMC com a DM tipo I em humanos.

Em humanos com DM tipo I, diversos polimorfismos já foram descritos especialmente em relação a genes relacionados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e a genes relacionados a produção de citocinas. Em cães, a pesquisa pela presença de tais polimorfismos, revelou a presença de haplótipos relacionados com o DLA (*Dog Leucocyte Antigen*) e diversas moléculas sinalizadoras/reguladoras do sistema imune. Além disso, estes polimorfismos estiveram associados com maior risco, ou com proteção ao desenvolvimento de diabetes nas raças mais predispostas e protegidas, respectivamente (KENNEDY *et al*., 2006; SHORT *et al*., 2007; CATCHPOLE *et al*., 2008; SHORT *et al*., 2009). Um dos haplótipos associados à DMC nestes estudos, o DLA-DQA1*001, também foi associado a hipotireoidismo canino, sugerindo se tratar de um alelo comum de suscetibilidade a endocrinopatias imunomediadas (CATCHPOLE *et al*., 2008).

Entretanto, em humanos a DM tipo I acomete crianças e adolescentes, também sendo denominada antigamente de diabetes juvenil (EISENBARTH, 2008), ao passo que a média de idade dos cães que recebem diagnóstico de diabetes é ao redor dos 10 anos de idade (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005). A DM em cães jovens é um achado extremamente raro (GRECO, 2001a), embora se encontrem esparsos relatos de diabetes em filhotes (SOUZA *et al*., 2004; PÖPPL *et al*., 2012), e Jouvion *et al*. (2006) tenham caracterizado uma insulite linfocítica em um filhote diabético. Além disso, DMC em filhotes eventualmente esta associada à atrofia pancreática exócrina (KANG *et al*., 2008; BRENNER *et al*., 2009). Estes achados motivam as discussões sobre a classificação da DM em cães, levando muitos pesquisadores a associarem a DMC à LADA (*latent autoimmune diabetes of the adult*), que é caracterizada como um DM tipo I de lenta progressão afetando indivíduos adultos maduros (RAND *et al*., 2004; SHORT *et al*., 2009).

As lesões patológicas mais comuns em cães com DM são uma redução no número e tamanho das ilhotas de Langerhans, um reduzido número e degeneração hidrópica de células β nas ilhotas (HOENIG, 2002). Ausência absoluta congênita de células β, e aplasia ou hipoplasia de ilhotas pancreáticas já foram descritas em cães com DM (NELSON, 2004). Alterações menos severas nas células β e nas ilhotas podem predispor o cão adulto à DM frente a uma exposição a fatores ambientais de risco (FELDMAN & NELSON, 2004). Estes fatores podem induzir a degeneração de células β secundariamente à resistência crônica à insulina ou podem causar liberação

de proteínas celulares provenientes de células β que se tornam alvos da destruição imunomediada das ilhotas de Langerhans (FELDMAN & NELSON, 2004). Infiltração linfocitária é um achado raro em cães, diferentemente do que ocorre na DM tipo I de humanos e em bovídeos. É provável que ocorram infiltrados leucocitários nas ilhotas pancreáticas no início do processo autoimune, e não estejam mais presentes no momento da morte da maioria dos cães diabéticos (HOENIG, 2002). Ainda segundo Hoenig (2002), após episódios de pancreatite, 30% dos casos apresentam destruição de ilhotas, as quais foram substituídas por tecido fibroso. Em outros casos ocorre degeneração de ilhotas ou nenhuma ilhota é encontrada. Nestes casos, apesar da destruição ser mediada pelo sistema imune, não há um componente humoral como observado nos casos de insulite linfocítica (RAND *et al.*, 2004; CATCHPOLE *et al.*, 2005).

Em relação à DMC associada a outras doenças endócrinas, frequentemente são identificados na rotina cães portadores de diabetes e hipotireoidismo associados. Esta associação suporta o hipotireoidismo como um possível fator de risco para DMC, não só pela possível mesma base genética (CATCHPOLE *et al*., 2008), como também, pela indução de um estado de resistência insulínica frente a hipofunção das tireoides (HOFER-INTEEWORN *et al*., 2009). Com relação à síndrome de Cushing, o hipercortisolismo endógeno promove uma resistência insulínica bastante severa em cães e associado à hiperinsulinemia (FUKUTA *et al*., 2012). No tecido muscular, o cortisol inibe a captação de glicose e as vias intracelulares de sinalização da insulina, ao passo que nos hepatócitos o cortisol ativa gliconeogênese, lipogênese e gliceroneogênese através da ativação da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). No tecido adiposo periférico estimula a atividade de lipase hormônio-sensível, e inibe a lipase lipoproteica, enquanto que no tecido visceral estimula a diferenciação dos pré-adipócitos e gliceroneogênese, favorecendo assim o acúmulo de gordura intra-abdominal (MICELI *et al*., 2012). Estes desarranjos metabólicos justificam porque a DMC ocorre de forma secundária à síndrome de Cushing (PERTERSON *et al*., 1984; FALL *et al*., 2007), além de que na célula β, o cortisol interfere com a síntese e secreção de insulina, estimulando apoptose (MICELI *et al.*, 2012).

Em cães, foi demonstrado por Imamura *et al*. (1988) que cães expostos a pancreatectomia parcial, e expostos a hiperglicemia persistente da ordem de 250

mg/dL por cerca de 2 semanas podem desenvolver diabetes insulino-dependente severa em decorrência de perda permanente da função das células β, fenômeno conhecido como glicotoxicidade. Este mecanismo de exaustão de células β tem sido sugerido como um mecanismo potencial associado ao surgimento de DMC frente a situações de resistência à insulina como obesidade, diestro e acromegalia (VERKEST *et al*., 2011a,b; MARED *et al*., 2012). Estudos *in vitro* com células β podem ser úteis na identificação destes mecanismos (O`DRISCOLL *et al*., 2004). A seguir serão discutidos fatores de resistência à insulina potencialmente associados à diabetes em cães, gatos e humanos.

3.2.2 Papel do sobrepeso e de fatores dietéticos

Intolerância a carboidratos induzida por obesidade é um fenômeno bem descrito no cão, assemelhando-se a DM tipo II em humanos, porém a deposição de amilóide em ilhotas, que é considerado o marcador patológico da DM tipo II em humanos e felinos não é documentada em cães diabéticos, o que torna reconhecimento desta forma da doença bastante raro em cães (MATTHEEUWS *et al*., 1984; HOENIG, 2002) se é que pode ser considerado (RAND *et al*., 2004; VERKEST *et al*., 2012). Apesar disto, foi demonstrado por Sowa *et al.* (1990) que o polipeptídeo amilóide pancreático causa resistência periférica à insulina in vivo em cães. 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). Porém, infelizmente mesmo nos casos onde se documenta uma capacidade residual de secreção de insulina em alguns casos de DMC aparentemente secundárias a quadros de resistência à insulina, como p.ex. obesidade, estes cães necessitam de terapia com insulina para diminuir a hiperglicemia e evitar a progressão para cetoacidose diabética (SCHULMAN, 2003; FELDMAN & NELSON, 2004).

Foi postulado por Rand *et al*. (2004) que ainda que a obesidade cause resistência à insulina em cães, não existem trabalhos bem documentados que demonstrem que a DM tipo II é uma doença significante em cães. Neste trabalho, Rand *et al*. (2004) afirmam que nenhum trabalho epidemiológico havia sido publicado avaliando a relação entre obesidade e DM em cães desde 1960, onde se observou que a

prevalência de DM era maior em cães obesos (KROOK *et al*., 1960). A obesidade é um fator de risco bem estabelecido para DM tipo II em gatos e 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 intolerância à glicose (MATTHEEUWS *et al*., 1984). Entretanto o estudo de Mattheeuws *et al*. (1984) utilizou cadelas intactas e das 15 pacientes com DM e secreção residual de insulina, 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).

Um estudo epidemiológico conduzido na região de Porto Alegre (Brasil) evidenciou que 69,2% 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 comida caseira mais ração a cada refeição, e que outros 28,6% deles recebiam somente comida caseira como dieta no momento do diagnóstico. Nesta população de pacientes diabéticos estudada, 78,6% deles recebiam petiscos como pães, biscoitos, doces e chocolates fora dos horários das refeições, o que corrobora a hipótese da obesidade e 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 administração de petiscos nos pacientes diabéticos quando comparados aos controles. Os mesmos autores, também demonstraram que os cães diabéticos estavam menos expostos a atividades físicas intensas em comparação aos cães controles. Wejdmark *et al*. (2011), demonstraram que cadelas diabéticas da raça Elkhound, que basicamente só desenvolvem diabetes secundária a progestágenos, tinham uma chance 3,5 vezes maior de terem sido expostas a obesidade ao longo da vida antes de terem desenvolvido a doença.

Estes efeitos da obesidade são particularmente pronunciados quando a obesidade é resultado de uma dieta rica em gordura saturada. Cães alimentados com uma dieta rica em gordura desenvolvem resistência insulínica não compensada por aumento na secreção de insulina 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). Contudo, Verkest *et al.*, (2012) observaram que cães com obesidade induzida por dieta rica em gordura não se comportam como cães naturalmente obesos em estudos de sensibilidade à insulina, o que pode ser um viés importante em estudos que avaliam sensibilidade à insulina em cães experimentalmente obesos. De fato, cães naturalmente obesos não apresentam diferenças na glicemia basal em comparação a cães magros (FARIA *et al*., 2005). Contudo, cães naturalmente obesos apresentam no período pós-prandial valores mais elevados de glicemia, trigliceridemia e insulinemia do que cães magros (VERKEST *et al*., 2012), o que é interessante, uma vez que apesar da hiperglicemia e hipertrigliceridemia pós-prandiais serem características comuns da DM tipo II, esta é marcada por uma perda/atenuação da primeira fase de secreção de insulina, o que não acontece nos cães obesos. Este achado, associado ao fato de que cães não apresentam depósito de amiloide nas ilhotas reforça a não existência de DM tipo II como documentada em gatos e humanos na espécie canina (VERKEST *et al.*, 2012).

Além disto, evidências em outros modelos apontam para os efeitos deletérios da obesidade sobre a sensibilidade à insulina e predisposição à DM. O tecido adiposo atualmente não é mais visto como um tecido inerte e de armazenamento de energia somente, mas sim como um tecido endocrinologicamente ativo e associado à produção de diversas adipocinas - hormônios produzidos pelos adipócitos (COSTA & DUARTE, 2006; RADIN *et al*., 2009). De uma forma geral, quanto maior a adiposidade do indivíduo, maior a produção de adipocinas (KIL & SWANSON 2010). Dentre estas, os ácidos graxos livres (AGLs) reduzem tanto a captação de glicose muscular como a secreção de insulina (lipotoxicidade), ao tempo que aumentam a produção hepática de glicose (McGARRY, 2002). Os AGLs também estão associados à reduzida fosforilação de mensageiros intracelulares da insulina, resultando em menor resposta insulínica (SALTIEL & KAHN, 2001). Outro ponto interessante associado à obesidade é a maior produção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo (TNF-α, IL-6 p.ex.), caracterizando a obesidade como uma condição de inflamação branda crônica (KIL & SWANSON, 2012), que pode ser revertida após a perda de peso (GERMAN *et al*., 2009; WAKSHLAG *et al*., 2011). Como efeito da produção destas citocinas, há não só uma ativação do sistema imune, o que pode estar relacionado à gênese de processos patológicos, mas também ocorre a indução de um estado de resistência periférica à insulina, uma vez que estas citocinas interferem com os

mecanismos de sinalização intracelular da insulina por diversos mecanismos (GRIMBLE 2002; KING 2008; TILG & MOSHEN 2008).

Em gatos, humanos e roedores, há uma relação oposta entre adiposidade e a produção de adiponectina, uma adipocina com efeitos pró-insulínicos, sendo este fato postulado como uma das razões da resistência insulínica observada na DM tipo 2 (RADIN *et al*., 2009; VERKEST *et al*., 2011a,b). Contudo na espécie canina, apesar de inicialmente ter-se demonstrado redução na concentração de adiponectina frente à obesidade induzida (ISHIOKA *et al.*, 2006), o mesmo fenômeno não foi observado em cães naturalmente obesos, levando a especulação de que a não supressão da adiponectina em cães obesos atuaria de forma protetora contra o desenvolvimento de DMC, uma vez que receptores para adiponectina são expressos nas células β, e assim poderia atuar protegendo estas células do fenômeno da glicotoxicidade (VERKEST *et al.*, 2011a,b). Da mesma forma, a hiperleptinemia observada na obesidade em cães, gatos, humanos e roedores pode estar no cão atuando como um estímulo à compensação da resistência insulínica induzida pela obesidade, apesar de que classicamente observa-se redução da secreção de insulina frente à hiperleptinemia (VERKEST *et al*., 2011).

3.2.3 Papel do ciclo estral

As fêmeas são afetadas duas vezes mais que os machos (FLEEMAN & RAND, 2001), e cerca de 70% dos pacientes diagnosticados com diabetes são fêmeas (CATCHPOLE *et al*., 2005). Um estudo em Porto Alegre 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 (GUPTILL *et al*., 2002). Apesar disto, não há diferença marcante na resposta à insulina ou glicose entre machos e fêmeas na espécie canina (RENAULD & SVERDLIK, 1975), diferentemente do observado na espécie felina, onde os machos são naturalmente mais resistentes à insulina (RAND *et al.*, 2004).

A DM em fêmeas intactas é frequentemente associada com a fase do ciclo estral onde predomina a progesterona (diestro), e assemelha-se à diabetes gestacional (DMG) em humanos (CATCHPOLE *et al.*, 2005). Diversos estudos demonstram de

forma inequívoca a existência de um quadro de resistência à insulina durante o diestro em cadelas (SCARAMAL *et al.*, 1997; FUKUTA *et al*., 2012; MARED *et al*., 2012). Pöppl & González (2005) evidenciaram que 69,2% de 19 fêmeas identificadas com DMC estavam na fase de diestro no diagnóstico inicial. Contudo, Johnson (2008) cita uma frequência de somente 8% em um grupo de 65 cães diabéticos nos EUA. Tais diferenças podem refletir a prática de castração precoce nos Estados Unidos reduzindo a incidência de diabetes em fêmeas caninas. No Reino Unido, a redução no uso de progestágenos sintéticos e a prática de esterilização das fêmeas não reprodutoras vêm reduzindo a DM decorrente do diestro em cadelas, levando a distribuição similar de DMC entre machos e fêmeas (CATCHPOLE *et al*., 2005).

Na espécie canina, a progesterona, assim como os progestágenos sintéticos podem aumentar a liberação de GH pelo tecido mamário, sendo um importante fator envolvido na resistência à insulina, além de também estar associada ao surgimento de tumores de mama, hiperplasia endometrial cística-piometra e acromegalia (EINGENMANN *et al*., 1983; 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 (nove semanas) e considera-se o perfil hormonal do diestro e das prenhes praticamente idênticos (FLEEMAN & RAND, 2001). Cadelas com DM transitória causada 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 à castração (FELDMAN & NELSON; 2004). Entretanto, Fall *et al*. (2008b) demonstraram remissão de DMG em 7 cadelas de 12 que foram submetidas à castração, evidenciando que especialmente quanto mais rápida for realizada a cirurgia, maior a chance de remissão do quadro diabético, especialmente se associados a gestação, uma condição de resistência à insulina ainda mais severa do que no diestro (CONNOLY *et al*., 2004, BATISTA *et al*., 2005). A ovariectomia promove um aumento significativo na resposta insulínica frente à administração de glicose, sendo possível inclusive observar hipertrofia de ilhotas de Langerhans e maior desgranulação das células beta (RENAULD *et al*., 1987). Se a DM persistir após o fim do diestro,

deve-se re-classificar como DMID (RAND *et al*., 2004). Na raça Nórdica Elkhound, DMC ocorre praticamente exclusivamente secundária a diestro ou gestação, e em uma série de 63 casos, onde 39 foram submetidas à castração, a remissão do quadro diabético foi possível em 18 (FALL *et al.*, 2010).

O aumento na concentração sérica de progesterona durante o diestro pode causar diabetes em cães por promover um efeito antagônico à insulina diretamente por reduzir a ligação de insulina e transporte de glicose nos tecidos alvos (RYAN & ENNS, 1988; RAND *et al*., 2004) e secundariamente por promover a liberação de hormônio do crescimento (GH) pela glândula mamária (SELMAN *et al*., 1994, RIJNBERK *et al*., 2003). O GH exerce um efeito antagônico à insulina por reduzir a concentração de receptores à insulina, reduzindo a captação de glicose (MOLLER & FLIER, 1991), apesar de Dominici *et al*. (2005) considerarem a redução na concentração do IR na membrana celular das células alvo, como uma *down-regulation* decorrente da hiperinsulinemia promovida pela resistência insulínica gerada pelo GH. Os efeitos lipolíticos do GH também são antagônicos aos efeitos da insulina (GANONG, 2005). Outros autores levantaram evidências de resistência tecidual aos efeitos hipoglicemiantes, lipogênicos e antilipolíticos da insulina em cães frente a FSH e LH (RENAULD *et al*., 2003). Além disso, Batista *et al*. (2005) demonstraram que a exposição crônica a progesterona e estradiol causa uma redução intensa na sensibilidade à insulina especialmente no tecido muscular. De acordo com esta observação, Pöppl *et al*. (2012) demonstraram menor atividade de tirosina-quinase basal em preparações de membranas musculares de cadelas em estro e diestro, bem como menor afinidade de ligação insulina-receptor neste tecido (PÖPPL *et al.*, 2009).

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 em decorrência de ambas vias de sinalização intracelular do GH e de seu principal efetor (IGF-I) convergirem com as vias de sinalização da insulina (DOMINICI *et al*., 2005).

Interessante o fato de que se associada à inflamação, a resistência insulínica promovida pelo diestro torna-se ainda mais intensa, como fica evidente, ou pelo menos sugerido, frente a situações inflamatórias/sépticas relatadas como abcesso renal e

piometra (HESS & ILAN, 2003a; PÖPPL *et al.*, 2009), ou situações inflamatórias crônicas como obesidade e periodontite por exemplo (SKAMAGAS, 2008; KIL & SWANSON, 2010).

3.2.4 Papel da doença periodontal

Os avanços nas tecnologias disponíveis e estudos de manutenção nutricional do paciente diabético associado à maior consciência dos proprietários/tutores com relação à posse responsável, e ao maior cuidado dos veterinários com doenças concomitantes como as infecções do trato urinário e doenças periodontais, vêm contribuindo para maior sucesso da terapia em longo prazo dos animais diabéticos e consequente redução da mortalidade (GUPTILL *et al*., 2002). Esta observação referente ao maior cuidado com doenças periodontais estar associado à maior controle da diabetes, está diretamente associado a observações e diversos trabalhos publicados com humanos, onde fica claro o papel prejudicial da periodontite sobre o controle glicêmico de pacientes diabéticos (SHIP 2003; TAYLOR 2003; KING, 2008; MADDEN *et al*., 2008).

A periodontite caracteriza-se por um processo inflamatório/infeccioso afetando o tecido periodontal, comumente decorrente de excessiva presença de cálculos dentários ("tártaro") que surgem a partir da calcificação da placa dentária; um biofilme bacteriano aderido à superfície dos dentes (NIEMIEC, 2008). Os cálculos dentários supra-gengivais progridem em direção à gengiva provocando inflamação local (gengivite). A partir do momento em que os cálculos tornam-se sub-gengivais, tem início o processo de inflamação/infecção do tecido periodontal. O biofilme presente inicialmente à periodontite é o problema clínico mais diagnosticado na clínica de pequenos animais, porém também é a doença menos tratada uma vez que os sinais de evolução da doença são pouco percebidos pelos donos, de forma que a terapêutica só é iniciada na maioria das vezes após atingir estágios muito graves (NIEMIEC, 2008). As consequências da periodontite envolvem uma série de repercussões locais e sistêmicas, dentre eles a diabetes mellitus. Contudo, a relação entre a periodontite e a diabetes é uma "via de mão-dupla" (MEALEY, 2006).

Pacientes humanos diabéticos apresentam maior risco de desenvolvimento de periodontite, a qual comumente apresenta uma evolução mais veloz e agressiva nestes

pacientes (SHIP, 2003). Diversos mecanismos já foram estudados justificando esta observação, muitos destes compartilham características comuns com as envolvidas nas complicações crônicas da diabetes como na retinopatia, nefropatia, neuropatias, vasculopatias e alterações na capacidade de cicatrização (MEALEY, 2006). As pesquisas iniciais falharam em demonstrar diferenças na flora bacteriana subgengival de pacientes humanos diabéticos e não diabéticos (MEALEY, 2006). Como a periodontite apresenta um componente infeccioso, passou-se a estudar possíveis diferenças na resposta imune ao processo inflamatório/infeccioso representado pela periodontite, demonstrando-se um prejuízo na resposta celular e na aderência, quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos, monócitos e macrófagos de indivíduos diabéticos. Desta forma, esta primeira linha de defesa prejudicada permite um maior crescimento bacteriano no espaço periodontal, com consequente maior destruição tecidual (RYAN *et al*., 2003; MEALEY, 2006; ALVES *et al*., 2007). Além disso, pacientes humanos diabéticos apresentam uma resposta exagerada de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α e a IL-1β, tanto no líquido cravicular gengival, quanto no sangue, sugerindo uma hiper-resposta local e sistêmica a este quadro inflamatório/infeccioso (MEALEY, 2006; RYAN *et al*., 2003). O grau de hiperglicemia parece exercer um papel importante neste controle, uma vez que quanto pior o controle glicêmico, maiores as concentrações destas citocinas (ENGEBRESTON *et al*., 2004).

Outra particularidade da diabetes que predispõe a maior velocidade e gravidade de evolução da periodontite é a reduzida capacidade de cicatrização, uma vez que os fibroblastos que fariam a reparação do tecido periodontal não mantêm uma função adequada em ambientes hiperglicêmicos (MEALEY, 2006). As dislipidemias típicas da diabetes também já foram associadas a menor atividade destas células de defesa (RYAN *et al*., 2003). Além disto, o colágeno depositado pelos fibroblastos sofre catabolismo frente à insuficiência de insulina, o que favorece uma maior perda óssea e destruição tecidual em pacientes com periodontite e hiperglicemia crônica (MEALEY, 2006; ALVES *et al*., 2007). Completando as alterações associadas à diabetes que favorecem a evolução da periodontite, pode-se citar a elevada glicosilação de proteínas, processo não-enzimático e irreversível, que está associado à ocorrência de diversas complicações crônicas da diabetes como a disfunção endotelial, proliferação de vasos e alterações em componentes da matriz extra-celular. O acúmulo

destes produtos glicosilados estimula uma maior resposta inflamatória contra os patógenos periodônticos uma vez que a interação destes produtos com receptores na membrana celular das células inflamatórias resulta em elevada produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α e IL-1β (RYAN *et al*., 2003; MEALEY, 2006; ALVES *et al.,* 2007).

Ainda no campo das alterações promovidas pela diabetes que favorecem o desenvolvimento da periodontite, hiposalivação e alterações na composição da saliva auxiliam na redução das respostas imunológicas na boca, uma vez que a saliva é o principal fator de defesa na boca pela presença de IgG, IgA e lisozima. A hiposalivação pode ocorrer como resultado de neuropatia autonômica, doença microvascular e hiperglicemia, sendo um distúrbio comum em humanos diabéticos. Além do mais, a maior concentração de glicose na saliva de diabéticos predispõe ao crescimento bacteriano e diminui a capacidade de tamponamento da saliva, o que é um fator de risco também para doença periodontal. A maior secreção de cálcio na saliva do paciente diabético predispõe a formação de cálculos dentais (ALVES *et al*., 2007).

A periodontite prejudica o controle glicêmico de pacientes diabéticos, uma vez que o processo inflamatório/infeccioso representa um estado inflamatório crônico com elevação de interleucinas pró-inflamatórias não só no tecido afetado, mas também na circulação sistêmica. Clinicamente, observa-se aumento na resistência à insulina e pior controle glicêmico em pacientes com periodontite (SHIP, 2003; TAYLOR 2003; SKAMAGAS *et al*., 2008). Em pacientes humanos, demonstrou-se que o tratamento periodontal pode ao reduzir o estado inflamatório, reduzir a resistência à insulina (MEALEY, 2006; TAYLOR 2003). Madden *et al*. (2008) demonstrou que um mínimo tratamento não-cirúrgico para gengivite foi efetivo em promover a redução nas concentrações de HbA1c. A literatura veterinária é escassa em trabalhos que tenham avaliado ou descrito tais interações em animais de companhia. Rand *et al*. (2004) relaciona a doença periodontal como um fator de risco para DM em felinos na Australia (RAND *et al*., 2004). Van Nice (2006) e Pöppl *et al*. (2009) reportaram casos de cães diabéticos com descontrole glicêmico associado a múltiplas infecções dentarias e periodontais. Em ambos os casos, a extração dos dentes comprometidos, e profilaxia oral, permitiram o restabelecimento do controle glicêmico. Contudo não foram localizados na presente revisão, trabalhos de pesquisa relacionados a este tema nos últimos trinta anos (INOZHEB & ANSEROB, 1973; MATSSON *et al*, 1980).

Ao longo dos últimos anos, vem-se cada vez mais conhecendo as interações entre o sistema imune e o sistema endócrino, sendo a interação entre a IL-1 e o metabolismo da glicose um dos principais exemplos disto (BESEDOWSKI & DEL REY, 1989). A citocina IL-1β 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 na diabetes mellitus (DM) tipo I (OHARA-IMAIZUMI *et al.*, 2004). O fenômeno da glicotoxicidade parece envolver a produção de IL-1β pelas células β pancreáticas em resposta a hiperglicemia (MAEDLER *et al.*, 2002). Também foi demonstrado o papel da IL-1 na estimulação de necrose nas células β pancreáticas (STEER *et al*., 2006) e a predisposição à maior vulnerabilidade das células β à destruição auto-imune (WACHLIN *et al*., 2003).

Durante o desenvolvimento da DM tipo I diversas citocinas como a IL-1, IFN-β e TNF-α medeiam a disfunção e degeneração das células beta, em parte pela indução da enzima oxido nítrico-sintetase (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 consequente 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 vias pode ocorrer, ajudando a explicar a 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 fosfatidil-inositol-3-quinase em resposta a IL-1α em adipócitos (HE *et al*., 2006). Jager *et al*. (2006) demonstraram uma menor expressão do IRS-1 induzida pela IL-1β.

Estados inflamatórios crônicos como a periodontite, doença mais frequente em cães, atingindo cerca de 80% da população canina, apresenta potencial de causar elevação na concentração plasmática de IL-1β e TNF-α. Estas citocinas podem produzir resistência à insulina similar a observada na diabetes além de estarem 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 da diabetes, especialmente da 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 carboidratos.

3.2.5 Fisiopatogenia da diabetes

Uma vez estabelecida a deficiência absoluta ou relativa da liberação de insulina pelas células beta, ocorre uma redução na utilização tecidual de glicose, aminoácidos e ácidos graxos (NELSON, 2004). O fígado acelera os processos de glicogenólise e gliconeogênese, gerando um excesso de glicose no sangue. Este processo é mediado não somente pela falta de insulina, como também pelo excesso relativo de glucagon. A glicose proveniente da dieta também contribui para a hiperglicemia, que por sua vez prejudica ainda mais a secreção de insulina e a sensibilidade tecidual à mesma (SCHULMAN, 2003). Toda glicose circulante é livremente filtrada nos glomérulos renais, contudo, as células dos túbulos renais proximais apresentam uma capacidade limitada de reabsorver esta glicose do ultra filtrado glomerular. Em cães este limiar é ultrapassado quando a glicemia fica acima de valores de 180 a 220 mg/dL. Nesta situação ocorre a presença de glicose na urina (glicosúria). Esta glicosúria promove diurese osmótica, impedindo a água de ser reabsorvida ao longo do néfron, levando assim a poliúria. O centro da sede, localizado no hipotálamo é ativado quando detecta aumento na osmolaridade do líquido cefalorraquidiano e/ou, quando recebe estímulos aferentes dos barorreceptores pulmonares, atriais, aórticos, carotídeos e renais em situações de hipovolemia, desencadeando a procura por líquidos para correção do estado hídrico corporal. Como o processo é constante, ocorre uma polidipsia compensatória à poliúria, numa tentativa de prevenir a desidratação (FELDMAN & NELSON, 2004).

Apesar da hiperglicemia, a reduzida utilização de glicose pelos tecidos periféricos (adiposo, muscular e hepático) decorrente da hipoinsulinemia, leva o organismo a ativar vias catabólicas, como se estivesse em uma situação de jejum prolongado. A insulina suprime o sistema lipase hormônio-sensível, e frente a sua redução ocorre acentuada lipólise, gerando ácidos graxos livres não esterificados (utilizados como fontes de combustível oxidativo extra-hepático, também sendo assimilados pelo fígado) e glicerol (utilizado na gliconeogênese). A insulina também

apresenta um efeito anabólico sobre a musculatura e na sua ausência ocorre catabolismo de proteínas como fonte de aminoácidos para a gliconeogênese (SALTIEL & KAHN, 2001; GRIFFIN & OJEDA, 2004;) Esta lipólise e proteólise intensas associados à perda calórica representada pela glicosúria são responsáveis pela perda de peso dos pacientes (GRECO, 2001b). Dois centros hipotalâmicos controlam a ingestão de alimentos: o "centro da fome" na região lateral, responsável pelo controle da quantidade de alimento ingerido, e o "centro da saciedade", localizado na região ventro-medial. O centro da fome está sempre ativo, invocando o comportamento de procura por alimento, através da ativação de vias neurais eferentes oroxígenas. No entanto, este centro é temporariamente inibido pelo centro da saciedade após refeições, por vias neurais eferentes anorexígenas. A insulina é um importante regulador e ativador do centro da saciedade, e na sua ausência associado ao processo catabólico, ocorre um estímulo a polifagia. Outros mecanismos neuroendócrinos complementam o controle do apetite e peso corporal (GRIFFIN & OJEDA, 2004). Desta forma, temos a fisiopatologia dos ditos 4 P´s da diabetes (poliúria, polidipsia, perda de peso e polifagia).

3.2.6 Epidemiologia

O pico de prevalência da DM em cães é entre os 7 e 9 anos (GRECO, 2001b), com uma incidência de 1:100 a 1:500 (NELSON, 2004). Guptill *et al*. (2002) citam uma prevalência de 1:270 nos EUA, enquanto Pöppl & 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 está estimada entre 0,0005% e 1,5% (0,32% no Reino Unido). Esta incidência está 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 conhecimento dos veterinários (hipótese suportada pela redução na mortalidade destes pacientes de 37% para 5% no mesmo período), mas também devido à maior prevalência de obesidade nos animais, alimentação desequilibrada, estresse e sedentarismo (GUPTILL *et al*., 2002; NEUVIANS & BERGER, 2002; RAND *et al*., 2004; CATCHPOLE *et al*., 2005; KLINKENBERG *et*

al., 2006). O estilo de vida moderno acaba predispondo ao ganho de peso e sedentarismo, um importante fator de risco associado ao desenvolvimento de diabetes em humanos.

Predisposição genética para o desenvolvimento da doença através de associações familiares e estudos de pedigree foi descrito em cães Keeshounds (Wolf Spitz, cão lobo), raça pouco popularizada no Brasil (NELSON, 2004). Diversos estudos identificaram raças de cães com maior ou menor risco de desenvolver DM (HESS *et al*., 2000b; 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*., 2000b; GUPTILL *et al.*, 2002). 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 Retriver, American Pitbull Terrier, Boxer, Collie, Pequinês, e Pointer apresentam-se como as raças com menor risco de desenvolver DM (HESS *et al*., 2000b; GUPTILL *et al.*, 2002).

3.2.7 Manifestações clínicas

A história em praticamente todos os cães diabéticos envolve os sinais clássicos de poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso, sendo que poliúria e polidipsia não se desenvolvem até que ocorra glicosúria (NELSON, 2004). Ocasionalmente, o motivo da consulta pode ser a formação abrupta de uma catarata diabética (GRECO, 2001b). Nos casos em que o proprietário não repara o aparecimento destes sinais, o paciente corre sério risco de desenvolver cetoacidose diabética, coma e morte (FELDMAN & NELSON, 2004). A cetoacidose está presente no momento do diagnóstico em cerca de 35 a 40% dos casos, evidenciada muitas vezes por anorexia e vômitos ao diagnóstico (GRECO, 2001b; PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005). Uma anamnese minuciosa deve sempre ser realizada a procura de doenças concomitantes que estão presentes na grande maioria dos casos de DM. Em muitos cães, o antagonismo aos efeitos da insulina causado por outras doenças como pancreatite, infecções, insuficiência cardíaca congestiva, hiperadrenocorticismo

ou até um estro recente ou piometra, é o evento que desencadeia o início da doença (HESS *et al.*, 2000a). A identificação e tratamento destas desordens é fundamental para o sucesso da manutenção do paciente diabético (NELSON, 2004). Outras informações a cerca de tratamentos anteriores com drogas diabetogênicas, como glicocorticóides e progestágenos, devem ser questionadas a procura de possíveis fatores envolvidos. Deve-se questionar também que tipo de alimentação é fornecido ao animal e a quantidade de guloseimas que o mesmo recebe. Sabe-se que dietas ricas em carboidratos predispõem à obesidade, assim como dietas ricas em gordura, que também podem causar pancreatite, fatores intimamente ligados ao DM em cães. Frequentemente as fêmeas são apresentadas ao clínico após pouco tempo do último cio. O histórico de cio recente ao diagnóstico (menos de dois meses) é um achado comum observado em anamneses de até 69% das fêmeas diabéticas com diagnóstico recente (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005).

Um exame clínico completo é imperativo em qualquer animal com DM. O cão com DM não cetoacidótico não apresenta nenhum sinal clínico clássico. Os cães podem se apresentar obesos ou em boas condições físicas. Normalmente, cães com DM sem tratamento por certo tempo apresentam perda de peso (DAVISON, 2012). A caquexia e emaciação estão relacionadas a doenças concomitantes como a insuficiência pancreática exócrina, por exemplo, ou deficiência crônica de insulina por meses (FELDMAN & NELSON, 2004). Ocasionalmente o paciente pode apresentar-se caquético em decorrência da prescrição de tratamento dietético somente, sem terapia insulínica associada. Estes pacientes normalmente sobrevivem menos de seis meses (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005). Letargia pode ser evidente. Pêlos esparsos, secos e quebradiços podem estar presentes assim como pêlos brilhosos e diferentes graus de hiperqueratose. Hepatomegalia devido à lipidose hepática induzida pelo DM pode ser palpável ou detectável no exame ultra-sonográfico (NELSON, 2004). Desidratação é o achado clínico mais comum em cães diabéticos (48%), seguido de emagrecimento (44%) e catarata (40%) (GRECO, 2001b).

Contudo, é importante ressaltar que Hess *et al*. (2000a) em uma série de 221 casos de diabetes, relataram hiperadrenocorticismo, infecções de trato urinário, dermatites, otites, pancreatite, neoplasias e hipotireoidismo como comorbidades bastante frequentes, e sinais clínicos e sintomas relacionados a estas doenças podem estar evidentes no momento do diagnóstico.

3.2.8 Diagnóstico

O diagnóstico da doença requer a presença dos sinais clínicos apropriados, (i.e., poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso) associado à verificação de hiperglicemia persistente após jejum de 8 horas e glicosúria (GRECO, 2001a,b; FELDMAN & NELSON 2004; DAVISON, 2012). Os diversos aparelhos portáteis para medição da glicemia disponíveis permitem o rápido diagnóstico. É importante a determinação de ambas, hiperglicemia e glicosúria, pois a hiperglicemia diferencia o DM da glicosúria renal primária, e a glicosúria diferencia o DM de outras causas de hiperglicemia, apesar de que tipicamente pacientes diabéticos não complicados apresentam glicemias em jejum entre 250-450 mg/Dl (FELDMAN & NELSON, 2004). Hiperglicemia moderada pode ocorrer após duas horas da alimentação em alguns cães que tenham consumido rações pastosas, cães estressados, em casos de resistência periférica à insulina e nas fases iniciais da DM. Contudo, a terapia com insulina não é indicada nestes animais, devido à ausência de sinais clínicos de DM (FELDMAN & NELSON, 2004). A determinação da concentração sérica de fructosamina pode apresentar um recurso diagnóstico em cães muito estressados, ou agressivos no momento da colheita de sangue para dosagem de glicemia (KANEKO *et al*., 2008).

3.2.9 Exames complementares

Uma completa avaliação da saúde do cão diabético é recomendada logo após o diagnóstico inicial da doença para identificar qualquer doença concomitante que possa estar causando ou contribuindo para a intolerância à glicose (p.ex. hiperadrenocorticismo), que possa resultar da intolerância à glicose (p.ex. cistites bacterianas), ou estabelecer alterações no tratamento (p.ex. pancreatite). É indicado um perfil mínimo composto de ultra-sonografia, hemograma, perfil bioquímico sérico, e urinálise com cultura de bactérias e antibiograma. A ultra-sonografia é uma boa ferramenta para avaliar pâncreas, adrenomegalia, piometra e alterações hepáticas e do trato urinário (cistites, pielonefrite) (FELDMAN & NELSON, 2004).

3.2.9.1 Hematologia e bioquímica sanguínea

Em cães diabéticos não complicados é comum um hemograma sem alterações. Policitemia leve pode ocorrer nos casos de desidratação. Aumento na leucometria total pode ser causado por processos infecciosos ou inflamatórios. Desvio à esquerda e presença de neutrófilos degenerados ou tóxicos suportam o envolvimento de infecção na leucocitose (FELDMAN & NELSON, 2004). Nos cães com DM não complicado, o painel bioquímico seria considerado normal, exceto pela hiperglicemia.

O DM descontrolado é acompanhado de aumento nas concentrações de triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos livres devido à deficiência de insulina e a redução da atividade da lipase lipoproteica (FELDMAN & NELSON, 2004). Hiperamilasemia e hiperlipasemia também podem estar presentes quando há pancreatite aguda intercorrente, contudo para melhor avaliação de lesão pancreática pode-se solicitar testes mais específicos como a imunoreatividade sérica semelhante à tripsina (TLI) e lipase pancreática canina específica (cPL), hoje em dia feita com *snap tests* (KANEKO *et al*., 2008; DAVISON, 2012). A TLI ainda pode indicar insuficiência pancreática exócrina se estiver reduzida. As alterações mais comuns são aumento nas atividades das enzimas alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Os altos níveis de ALT, juntamente com reduzidos níveis de uréia, hipoalbuminemia e altos níveis de ácidos biliares podem indicar outra hepatopatia além da lipidose. Hiperbilirrubinemia é indicativo de obstrução extra-hepática, provavelmente, por pancreatite (FELDMAN & NELSON, 2004; KANEKO *et al*., 2008). Valores muito elevados de atividade de FA podem indicar hiperadrenocorticismo concomitante (NELSON, 2004). A uréia dos pacientes frequentemente pode-se mostrar com discretas elevações em decorrência do quadro catabólico, mesmo naqueles pacientes já em tratamento e mantidos normoglicêmicos (FREYSE *et al.*, 1996). Valores de potássio sérico elevados podem indicar acidose metabólica devido ao tamponamento do hidrogênio no meio intra-celular, que promove a liberação do potássio para o meio extra-celular (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005; DUROCHER *et al.*, 2008), porém naqueles casos onde há uma acidose importante, associada a falta de apetite, vômitos, ou ainda poliúria, o potássio passa a ser perdido e não reposto, de forma que a calemia destes pacientes pode encontra-se ainda elevada, dentro dos limites de referência, ou reduzidas (BOYSEN, 2008).

A concentração de fructosamina é uma mensuração de todas as proteínas glicosiladas séricas. Como a albumina é a principal proteína plasmática, e apresenta meia vida de aproximadamente 2 semanas, a concentração de fructosamina oferece um indicador confiável da glicemia nas últimas duas a três semanas (KANEKO *et al*., 2008). A determinação de fructosamina, associado aos sinais clínicos, dados de anamnese e registros do peso corporal do paciente oferecem embasamento para realização de ajustes na terapia insulínica (HOENIG, 2002). Com relação a distúrbios eletrolíticos, não são documentados maiores alterações em diabéticos não complicados, apesar de que pequenos desbalanços ácido-base são documentados mesmo na ausência de cetoacidose diabética (DUROCHER *et al*., 2008).

3.2.9.2 Urinálise

Na urinálise; glicosúria, cetonúria, lipúria, proteinúria, bacteriúria (com ou sem a presença de piúria) e hematúria, são achados comuns em pacientes com DM. Se grandes quantidades de cetonas forem detectadas no exame químico da urina, especialmente em um animal com sinais sistêmicos de doença (letargia, vômitos, diarréia ou desidratação), deve-se realizar o diagnóstico de cetoacidose diabética (discutida em outro capítulo) e estabelecer terapia apropriada (FELDMAN & NELSON, 2004; DAVISON, 2012). A presença de corpos cetônicos na urina na DM é considerada como diagnóstico de cetoacidose, mas não de diabetes. A cetonúria pode ocorrer em indivíduos saudáveis em jejum (KANEKO *et al*., 2008) enquanto a lipúria ocorre em doenças degenerativas dos túbulos, como acontece no DM canino (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005). De uma forma geral, quanto maior a concentração de cetonas, menor a insulinemia em pacientes com diagnóstico recente (DUROCHER *et al.*, 2008).

A densidade da urina de cães diabéticos é comumente maior que 1.025 a 1.035. Pacientes com diabetes e densidade urinária inferior a 1.020 são suspeitos de portarem alguma outra patologia associada à poliúria e polidipsia, freqüentemente um hiperadrenocorticismo (FELDMAN & NELSON, 2004). Proteinúria, frequentemente é resultado de infecções do trato urinário ou glomerulopatia hipertensiva, porém frequentemente coexistem hipertensão e elevação da relação proteína:creatinina e albumina:creatinina na urina de cães diabéticos (MAZZI *et al*., 2008). A cistocentese,

utilizando técnicas assépticas para urocultura e testes de sensibilidade, é indicada devido à elevada incidência de infecções do trato urinário ocultas em cães com DM (NELSON, 2004).

3.2.9.3 Testes hormonais

Alguns testes hormonais podem ser interessantes em cães diabéticos. Por exemplo, a determinação de insulina sérica basal permite avaliar se o paciente é um típico canino diabético (hipoinsulinêmico), ou se estamos frente a um paciente em um estado diabético frente a um quadro de resistência à insulina (normo ou hiperinsulinêmico). Nesta última situação, esforço deve ser empregado na resolução da causa da resistência à insulina, pela possibilidade de remissão do estado diabético (FELDMAN & NELSON, 2004). A mensuração da existência de capacidade residual de secreção de insulina em animais já em tratamento com insulina exógena, pode ser feito por meio de teste de estimulação por glucagon, avaliando a secreção de peptídeo-C na circulação (FALL *et al.*, 2008a). A determinação da concentração sérica de progesterona e/ou de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) pode ser útil na avaliação de uma fêmea diabética recém diagnosticada que não tenha seu histórico reprodutivo recente documentado, uma vez que pode ocorrer um estado diabético secundário a acromegalia estimulada pela progesterona (NELSON, 2004). Da mesma forma, um teste de supressão por baixa dose de dexametasona pode ser indicado de acordo com o perfil dos resultados de patologia clínica (hiperfosfatasemia, baixa densidade urinária) e anamnese do paciente (alopecia simétrica bilateral, abdômen pendular). Testes de avaliação da função tireoidiana (T4 total, T4 livre bifásico, T4 livre por diálise, TSHc) devem aguardar um controle do estado diabético antes de serem solicitados, uma vez que diabetes é uma causa comum de síndrome do eutireoideo doente (FELDMAN & NELSON, 2004).

3.2.10 Tratamento

A meta primária do tratamento do DM é a eliminação dos sinais clínicos secundários à hiperglicemia e à glicosúria, bem como a recuperação do estilo de vida habitual do animal, fuga dos episódios de hipoglicemia, e evitar as complicações

crônicas da doença (NELSON, 2004). No cão diabético isto pode ser obtido por uso de terapia insulínica apropriada, dieta, exercício e controle de distúrbios infecciosos, inflamatórios, neoplásicos e hormonais concomitantes (FLEEMAN & RAND, 2001). Apesar do objetivo da terapia ser controlar a glicemia, o clínico deve sempre evitar a hipoglicemia, complicação terapêutica séria e potencialmente fatal, normalmente decorrente de uma sobredose de insulina. A letargia tende a se resolver rapidamente após início da terapia insulínica, e a perda de peso normalmente cessa após a obtenção de um ótimo controle glicêmico. A resolução da poliúria e da polidipsia só ocorre após a manutenção da glicemia em valores abaixo do limiar renal de reabsorção de glicose (<180-250 mg/dl) (FELDMAN & NELSON, 2004). Na maioria dos cães diabéticos o processo de formação de catarata já se iniciou antes da obtenção de um adequado controle da glicemia, no entanto, quanto mais rígido o controle glicêmico, menor será a velocidade de progressão da catarata diabética (FLEEMAN & RAND, 2000).

3.2.10.1 Terapia insulínica

Apesar das preparações de insulina serem estáveis à temperatura ambiente, mantê-las sob refrigeração mantêm uma condição mais constante de armazenamento, levando a uma maior vida útil do produto. Além disso, congelar, aquecer, ou agitar vigorosamente o frasco inativa a insulina. Quanto melhor a conservação da insulina, maior a duração da atividade do hormônio no frasco. Contudo, uma recomendação que pode evitar prejuízos ao tratamento por perda do efeito da medicação é a troca periódica do frasco a cada 30-45 dias após aberto, como recomendam as bulas de insulinas humanas, independente do volume residual (NELSON, 2004). As insulinas recombinantes humanas são comercializadas atualmente na concentração de 100 U/mL, ou seja; 1 U de insulina representa um volume de 0,01 mL. Para as aplicações insulina, o cliente deve ser familiarizado com seringas de aplicação de insulina (30, 50 ou de 100 U – seringa de 1 mL) de forma a entender qual o volume a ser administrado. Erros de dosagem na seringa são causa comum de crises hipoglicêmicas por overdose de insulina. Seringas com capacidade máxima para 30 U (0,3 mL) são adequadas para grande maioria dos pacientes, tornando mais segura a administração de doses pequenas de insulina. Além disso, atualmente existem canetas para aplicação de insulina, que além de promoverem uma maior precisão de dose, retiram um pouco da

carga psicológica sobre o dono de estar aplicando uma “injeção” no seu animal. Destas, uma apresentação interessante é a caneta Novopen 3 Demi® (Novo Nordisk) que permite ajuste de doses de 0,5 em 0,5 U.

Com relação aos tipos de insulina disponíveis para o tratamento de cães diabéticos, a insulina regular cristalina é reservada para uso na terapia intensiva, ao passo que as insulinas disponíveis para o manejo de longo prazo do paciente no mercado nacional são a insulina de ação intermediária NPH (Neutral Protamine Hagedorn), a insulina lenta, e os análogos insulina glargina e insulina detemir (FELDMAN & NELSON, 2004; BEHREND, 2006; MORI *et al.*, 2008a; SAKO *et al.*, 2011, DAVISON, 2012). Estas preparações de longa ação são mais utilizadas no manejo de longo prazo do paciente diabético, por promoverem uma suplementação contínua por horas após uma simples injeção (FLEEMAN & RAND, 2001). Já a insulina regular tem um começo de ação rápido, e curto tempo de duração do efeito, sendo utilizada no controle intensivo de pacientes com cetoacidose diabética ou em trans-operatório (SCHULMAN, 2003). Eventualmente, pode-se lançar mão de misturas de insulinas de longa e curta ação disponíveis no mercado (70%NPH/30% regular, ou 50%NPH/50% regular) quando preparações mais convencionais de insulina falham em estabelecer o controle glicêmico devido a pico de ação tardio, por exemplo (NELSON, 2004).

Apesar de diferentes orientações na literatura quanto à dose inicial de prescrição para a insulina, a indicação da NPH como primeira escolha para cães parece unanime no Brasil, apesar da insulina NPH no cão poder ter uma duração de ação variando de 4 a 18, e pico de absorção ao redor de 2h pós aplicação, e eventualmente estar associada a hiperglicemia pós-prandial (PALM *et al*., 2009). A terapia insulínica pode ser iniciada com 0,25 U/Kg de insulina NPH, ou insulina lenta, de 12 em 12h em cães com glicemias menores de 360 mg/dL, ou e de 0,5 U/Kg em cães com glicemias maiores que 360 mg/Dl (FLEEMAN & RAND, 2001; FELDMAN & NELSON 2004; BEHREND, 2006). Na experiência do autor, doses iniciais de 0,4 a 0,5 U/Kg são adequadas na grande maioria dos casos, sendo que cães de grande porte podem precisar de doses iniciais de até 0,75 U/kg duas vezes por dia (SCHULMAN, 2003). A maioria dos animais em uso de insulina NPH, ou insulina lenta, atingirá um pleno controle glicêmico com doses variando de 0,5 a 0,9 U/kg. Contudo, alguns cães podem precisar de doses pequenas de insulina (p.ex. 0,25U/kg ou menos) para manter um

bom controle glicêmico, e doses maiores podem provocar efeito Somogyi e consequente mau controle (NELSON, 2004). Apesar de aplicações de doses iniciais menores protegerem da ocorrência de hipoglicemia, a persistência da hiperglicemia enquanto se ajusta dose ideal, apesar da introdução da insulinoterapia, pode acelerar o surgimento da catarata diabética. O uso de insulina duas vezes por dia diminui as chances de ocorrência de problemas como hipoglicemia e efeito Somogyi, além de facilitar o controle glicêmico (HESS & WARD, 2000; HESS, 2010).

A insulina lenta disponível no mercado veterinário é de origem suína, e apresenta a mesma sequência de aminoácidos da insulina canina, tornando-a não imunogênica para uso crônico. Contudo, é importante ressaltar que a apresentação em frascos de 40U/mL implica na necessidade de seringas especiais para aplicação de 40U/mL. Além disso, o volume pequeno de 2,5 mL por frasco desta preparação pode se tornar oneroso para cães de grande porte. Apesar de esta apresentação ser uma mistura de 70% lenta/30% regular, estudos farmacodinâmicos demonstraram que seu período de efeito é insuficiente para uso uma vez por dia, além de terem sido relatadas dificuldades no controle em longo prazo de pacientes fazendo uso uma vez por dia (HORN & MITTEN, 2000; PÖPPL *et al*., 2006). Em contrapartida, quando aplicada duas vezes por dia, um pico de ação inicial é detectado cerca de 3h após aplicação, seguido de um segundo pico de ação cerca de 9h após aplicação e uma média de duração do efeito de aproximadamente 14 horas (FLEEMAN *et al*., 2009).

Apesar das insulinas recombinantes humanas diferirem em apenas um aminoácido da insulina canina, a formação de anticorpos parece ser incomum em resposta a administração por longos períodos, apesar de possível (FELDMAN & NELSON, 2004; DAVISON *et al.*, 2008). Em contraste, a insulina bovina difere em apenas dois aminoácidos da insulina canina e é altamente antigênica em cães (DAVISON *et al.*, 2008). No entanto, atualmente estas insulinas não estão mais no mercado, tendo sido substituídas por insulinas humanas recombinantes, como foi o caso da insulina PZI (Zinco Protamina) bastante popular nos Estados Unido e útil no controle de cães diabéticos, porém não disponível no mercado nacional (MAGGIORE *et al*., 2012).

As insulinas glargina e detemir são análogos sintéticos da insulina humana, com pequenas alterações estruturais que promovem diferentes características de solubilidade e farmacocinética, sendo consideradas insulinas de longa ação. Ambas

foram desenvolvidas para promover uma ação basal de longa ação em humanos enquanto uma insulina de ação rápida pudesse ser administrada durante as refeições (FELDMAN & NELSON, 2004). Já se demonstrou p.ex. que a associação da glargina com a NPH promove um controle glicêmico intenso, porém com maior risco de ocorrência de hipoglicemia (MORI *et al.*, 2008a; SAKO *et al.*, 2011). A insulina glargina é recomendada inicialmente a uma dose de 0,25 U/kg a cada 12h, onde forma microcristais no tecido subcutâneo, fazendo com que ela tenha uma liberação lenta para a circulação. Contudo, Fracassi *et al*. (2012) demonstraram a ocorrência de picos de ação da glargina (nadir, ou glicemia mais baixa após aplicação) variando de 0 a 12 horas após aplicação, o que leva a considerar a glargina como não sendo uma boa escolha inicial de insulina para cães diabéticos. Além disso, se aplicada por via intramuscular ou intravenosa, a glargina comporta-se exatamente como se fosse insulina regular.

Em contrapartida, a insulina Detemir tem liberação lenta por unir-se a proteínas plasmáticas, podendo também ser usada por qualquer via. Contudo, o pico de ação da detemir ocorre cerca de 8-10h após aplicação, sendo capaz de manter um efeito hipoglicemiante por mais de 24h. Devido a este efeito forte e prolongado, a dose inicial recomendada de detemir é de 0,1 U/kg, não sendo assim recomendada para cães com menos de 10kg (SAKO *et al*., 2011; MICELI *et al*., 2012), ou como primeira escolha, apesar de ser capaz de promover adequado controle glicêmico, provavelmente melhor do que com uso da glargina. Já os análogos de insulina lispro, e aspart, são preparações sintéticas de ação ultra-rápida cuja aplicabilidade em medicina veterinária ainda é pequena (GILOR & GRAVES, 2010).

Após a aplicação da primeira dose de insulina diversas mensurações de glicemia podem ser realizadas (preferencialmente de 2 em 2 horas) durante o período em que se espera um pico máximo de efeito da insulina (2-8 horas) para verificar o risco de hipoglicemia. Se a glicemia se mantém acima de 150 mg/dl após a primeira injeção de insulina e acima de 270 mg/dl no momento da próxima aplicação é seguro liberar o paciente para ir para casa. Uma redução brusca de glicemia não é desejável, pois predispõe o paciente a um episódio hipoglicêmico após sucessivas aplicações da insulina. No entanto, estas medições seriadas após primeira dosagem podem não ser fidedignas, uma vez que a resposta máxima do paciente a insulina se dará após alguns dias de controle, e a não detecção de hipoglicemia após primeira aplicação de insulina

não significa que isto não poderá ocorrer. Fatores como estresse de coletas frequentes e internamento podem provocar elevações da glicemia e erros de interpretação. Da mesma forma, não é aconselhado tentar ajustar a dose perfeita frente às medições de glicose nos primeiros dias de aplicação da insulina (NELSON, 2004).

Se a resposta inicial a terapia não é satisfatória, não é aconselhável aumentar a dose inicial de insulina imediatamente, deixando o cão se ajustar àquela dose durante alguns dias (FELDMAN & NELSON, 2004). O objetivo das primeiras aplicações não é atingir um controle glicêmico excelente, mas sim permitir que o organismo se acostume com a presença da insulina e que cão e proprietário de adaptem a nova rotina e manejo. Em minha rotina, oriento os clientes como aplicar a insulina em casa, e como agir em caso de hipoglicemia. Em revisão clínica ou contato telefônico após 5 a 7 dias pode-se ter uma idéia da efetividade do tratamento e orientar pequenos ajustes iniciais se necessários. A responsividade à insulina melhora com o tratamento, uma vez que a hiperglicemia crônica está resolvida. Uma nítida melhora clínica com redução da letargia, polidipsia, poliúria e perda de peso são observadas após alcance de um bom controle glicêmico (BEHREND, 2006).

Uma dúvida frequente é decorrente da insulinoterapia frente a um procedimento cirúrgico. De uma forma geral, cirurgias eletivas em um paciente diabético podem ser adiadas até que se tenha um bom controle da doença. Contudo, eventualmente um procedimento cirúrgico pode ser necessário frente a algum quadro limitante a vida, ou na tentativa de remissão da diabetes em cadelas que desenvolvem diabetes durante o diestro, procedimento que faz parte do tratamento da DMC em fêmeas. Uma conduta prática é agendar o procedimento para o turno da manhã, recomendando que a refeição da manhã não seja administrada para que um jejum pré-operatório adequado seja respeitado, e que somente metade da dose de insulina seja aplicada. A partir daí, se mantém um controle da glicemia a cada 20 minutos, com objetivo de manter a glicemia entre 150 e 250 mg/dL. Para atingir este objetivo pode-se manter infusão IV de fluidos glicosados a 2,5 a 5% e/ou uso de insulina regular por via intramuscular em doses de cerca de 20% da dose da insulina usada em casa de acordo com as glicemias detectadas (FELDMAN & NELSON, 2004; NELSON, 2004). É fundamental a monitorização freqüente da glicemia no paciente anestesiado, uma vez que uma hipoglicemia pode provocar óbito e sob anestesia pode não haver nenhum sinal clínico da baixa concentração de glicose. Além disso, o procedimento

anestésico estimula produção de hormônios diabetogênicos, podendo gerar hiperglicemia que deve ser controlada. No geral, o prognóstico é bom e os animais podem voltar a receber o mesmo protocolo de terapia com insulina utilizado em casa, no turno ou dia seguinte ao procedimento (FELDMAN & NELSON, 2004).

3.2.10.2 Manejo alimentar

A dieta terapêutica apresenta um importante papel no tratamento do DM, sendo a correção da obesidade quando presente, e o incremento da quantidade de fibras da dieta, os dois principais passos para que se possa melhorar o controle glicêmico (FELDMAN & NELSON, 2004). Dietas contando alto teor de fibras solúveis e insolúveis demonstram efeitos benéficos no controle glicêmico de cães diabéticos, associado ainda a uma redução significativa nos níveis de colesterol plasmático, glicerol livre, fructosamina sérica e hemoglobina glicosilada, também ocorrendo uma melhora significativa na atividade e comportamento dos pacientes (KIMMEL *et al.*, 2000; GRAHAM *et al.*, 2002). Estes efeitos são obtidos por retardo no esvaziamento gástrico e absorção intestinal de nutrientes, resultado de um efeito direto sobre a difusão de glicose em direção às micro vilosidades intestinais e um efeito induzido pelas fibras sobre a liberação de hormônios gastrintestinais reguladores na circulação (GRAHAM *et al.*, 2002). Existem no mercado diversas marcas de rações que atendem as exigências de fibras em cães diabéticos, e a quantidade de fibra nestes produtos varia de 3 a 25% sobre a matéria seca (rações normais contem menos de 2% de fibras). No geral, dietas que contenham pelo menos 12% de fibras insolúveis ou, pelo menos 8% de uma mistura de fibras solúveis e insolúveis, são efetivas em melhorar o controle glicêmico de cães diabéticos (NELSON, 2004)

Desarranjos no metabolismo das gorduras são comuns em pacientes diabéticos e incluem concentrações séricas elevadas de colesterol, triglicerídeos, lipoproteínas, quilomicrons e ácidos graxos livres, além de lipidose hepática, aterosclerose e a predisposição para desenvolvimento de pancreatite (HESS, *et al.*, 2003b; RAND *et al.*, 2004; PÖPPL *et al.*, 2005). A ingestão de dietas ricas em gordura também leva a resistência insulínica, estimula a produção de glicose hepática e suprime a função das células beta (KAYALA *et al*., 1999). Desta forma é aconselhável alimentar cães diabéticos com dietas com baixo teor de gordura (menos de 30% de

gordura em uma base de energia metabolizável) (FELDMAN & NELSON, 2004). Este tipo de dieta também ajuda a reduzir o risco de pancreatite, controlar alguns aspectos da hiperlipidemia e a reduzir o incremento calórico da refeição favorecendo a redução ou manutenção de peso.

Algumas opções interessantes encontradas no mercado são a Royal Canin Weigth Control® (Diabetic) ou Obesity®, Hill´s w/d® ou r/d®, Purina DM® ou a ProPlan Reduced Calories®. No entanto, ressalva-se que é muito importante predizer uma resposta glicêmica ao alimento ingerido, uma vez que o regime terapêutico com a insulina é fixo. Desta maneira, as refeições devem conter os mesmos ingredientes e calorias (FLEEMAN & RAND, 2000). Eventualmente outras condições patológicas que se beneficiam de um tratamento dietético (insuficiência renal, hepatopatias, doença inflamatória intestinal, pancreatite) podem estar presentes no mesmo paciente. Nestes casos a dieta terapêutica para a co-morbidade presente tem preferência sobre uma dieta para diabéticos, uma vez que a dieta na DMC é somente um adjunto ao tratamento com insulina. Caso uma dieta especial para diabéticos não possa ser administrada, basta ajustar a dose de insulina ao alimento que esta sendo oferecido ao paciente (FLEEMAN & RAND, 2001; DAVISON, 2012).

A escala de alimentação deve ser realizada de modo a favorecer o efeito da insulina e minimizar a hiperglicemia pós-prandial. A ingestão calórica diária deve ser ingerida quando a insulina ainda está presente na circulação e capaz de promover a absorção da glicose absorvida da refeição. Tipicamente cães diabéticos recebem insulina duas vezes por dia e recebem duas refeições de tamanhos iguais no horário de cada aplicação de insulina (FLEEMAN & RAND, 2000). Este regime é prático por simplificar o regime terapêutico em casa, além de oferecer maiores chances de um bom controle glicêmico e muitos proprietários entenderem que estão recompensando seus cães com alimento após a aplicação da injeção (FELDMAN & NELSON, 2004). A aplicação de insulina antes da refeição mimetiza em parte a secreção fisiológica, contudo pode ser um procedimento arriscado caso o paciente não aceite o alimento após a insulina ter sido aplicada.

A obesidade causa uma redução na tolerância à glicose em cães e pode ser um importante fator envolvido na predisposição a DMC e nas variações na resposta à insulina em cães diabéticos (NELSON, 2004; DAVISON, 2012). A redução do peso melhora o controle glicêmico em cães e a sensibilidade à insulina por promover uma

menor produção de adipocitocinas inflamatórias (TNF-α, IL-1, IL-6) e outras adipocinas antagônicas à insulina secretadas pelo tecido adiposo (GERMAN *et al.*, 2009; WAKSHLAG *et al.*, 2011). O sucesso na redução do peso normalmente requer uma combinação de restrição calórica, alimentação com dietas com baixo teor de gordura e aumento do gasto calórico-energético via exercícios (GERMAN, 2006). É importante começar um regime alimentar que permita ao cão reduzir seu peso gradualmente até um peso corporal ideal. A insulina é um hormônio anabolizante, e cães recebendo altas doses podem estar predispostos à obesidade (FLEEMAN & RAND, 2001). O peso ideal para o paciente pode ser estimado com base na revisão dos arquivos médicos de quando este estava com uma condição corporal ideal ou por uso de tabelas com pesos específicos de cada raça. É muito importante estabelecer metas realistas para perda de peso para manter a complacência do cliente (FELDMAN & NELSON, 2004). Para alcançar uma perda de peso da ordem de 15%, os cães podem comer 55 x [peso inicial $(kg)^{0,75}$] kcal por dia durante 12 semanas (FELDMAN & NELSON, 2004).

3.2.10.3. Exercícios

Atividade física é um componente auxiliar importante no controle glicêmico em cães diabéticos uma vez que auxilia na redução de peso, eliminando assim a resistência insulínica induzida pela obesidade (NELSON, 2004). Além disso, exercícios estimulam a redução da glicemia por aumentar a mobilização de insulina do local de aplicação (presumivelmente via aumento na circulação sanguínea e linfática); aumentar a circulação sanguínea, e por consequência a disponibilidade de insulina nos músculos, além de aumentar a translocação de GLUT 4 para a membrana celular (FELDMAN & NELSON, 2004). O exercício também melhora a distribuição de glicose em pacientes hiperglicêmicos na presença de concentrações basais de insulina.[6] Ainda, a atividade física regular determina uma maior afinidade de ligação da insulina ao seu receptor, bem como uma maior expressão de substratos intracelulares importantes a propagação do sinalização insulínica intracelular (CHIBALIN *et al.*, 2000).

A rotina diária de um paciente diabético deve incluir exercícios de preferência na mesma hora do dia. Exercícios esporádicos e extenuantes podem causar

hipoglicemia e devem ser evitados, sendo que a melhor hora do dia para tais atividades é nos momentos pré-aplicação de insulina, onde a glicemia teoricamente esta se elevando (DAVISON 2012). Recomenda-se que a dose de insulina seja reduzida à metade em dias em que o animal seja submetido a exercícios prolongados e cansativos. É difícil acertar a dose de redução para cada animal, por isso recomenda-se fazer eventuais ajustes observando-se os sinais de hipoglicemia ou poliúria e polidipsia presentes nas próximas 24 a 48 horas. Os proprietários devem estar cientes dos riscos e sinais de hipoglicemia e ter a disposição uma fonte de glicose em caso de emergência (FELDMAN & NELSON, 2004). Contudo, é imperativo que a pratica de exercícios seja recomendada a pacientes em insulinoterapia bem controlados, uma vez que atividade física promove picos de secreção de hormônios diabetogênicos (adrenalina, glucagon, GH e cortisol), e na ausência de insulina, a atividade física pode provocar hiperglicemia (KOIVISTO *et al*., 1980).

3.2.11 Ajustes iniciais na terapia insulínica

Cães diabéticos requerem diversos dias para atingir um equilíbrio, antes que se indique alteração na dose ou preparação de insulina. Cães diabéticos são revisados inicialmente uma vez por semana, e a cada avaliação deve-se coletar informações do proprietário com relação à ingestão de água, produção de urina e estado geral do paciente. Deve-se realizar um exame físico completo e registrar alterações no peso do animal. É interessante que se obtenham valores de glicemia durante a manhã e a tarde para verificar o andamento do tratamento (NELSON, 2004). Considera-se adequado controle glicêmico quando se alcança o fim dos sinais clínicos de diabetes, associado a concentrações de glicose entre 100 e 250 mg/dl ao longo do dia (FLEEMAN & RAND, 2001). Os proprietários devem saber reconhecer os sinais de hipoglicemia, e também devem saber que um animal diabético bem controlado apresenta um bom estado corporal, não apresenta poliúria ou polidipsia, é ativo e alerta e pode apresentar algum grau de glicosúria, mas não de cetonúria (FLEEMAN & RAND, 2000).

Nenhum ajuste na dose de insulina é realizado naqueles cães que permanecem hiperglicêmicos nos primeiros dias, uma vez que o objetivo não é estabelecer um excelente controle glicêmico na primeira visita, mas sim iniciar a reverter o quadro metabólico provocado pela doença, permitir que o cão se adapte a

terapia insulínica e a nova ração, e acostumar o proprietário à nova rotina (NELSON, 2004; DAVISON 2012). Certamente haverá alguma mudança na dose de insulina ao longo do tratamento, no entanto estas só poderão ser realizadas pelo clínico após avaliações do paciente, sinais clínicos e eventuais exames complementares. O objetivo básico do tratamento é evitar as complicações comuns da DMC (catarata, cetoacidose, hipoglicemia, emaciação e poliúria/polidipsia). As complicações crônicas observadas em humanos diabéticos demoram décadas para se desenvolver, sendo incomuns em cães. Assim, a exigência de manter a glicemia dentro do considerado normal não existe na DMC (FELDMAN & NELSON, 2004).

3.2.12 Métodos para o monitoramento do controle do paciente

Diversos métodos podem ser utilizados para monitorar o controle glicêmico em cães diabéticos, e todas estas informações em conjunto irão informar melhor sobre o sucesso do tratamento (BEHREND, 2002). Para o controle da glicemia dos pacientes em casa, alguns autores recomendam que todo proprietário mantenha um diário contendo informações sobre o apetite do cão, comportamento geral, especialmente apatia, assim como semanalmente pesar e registrar o peso do animal, e verificar a presença de glicosúria e cetonúria na urina por meio de tiras reagentes (FLEEMAN & RAND, 2001). Estes clientes devem ser instruídos a jamais aumentar a dose de insulina baseado na quantidade de glicose na urina, devendo reportar ao veterinário a ausência de glicosúria persistente (sugestivo de hipoglicemia crônica) ou a presença de cetonúria (pode indicar descontrole da doença). A observação de aumento na ingestão de água e produção de urina, associados à letargia e perda de peso indicam a necessidade de ajustes na terapia insulínica. Considera-se a opinião subjetiva do proprietário sobre o estado geral do animal e resolução dos sinais clínicos a informação mais importante na avaliação inicial do controle glicêmico (NELSON, 2004). Quanto ao volume de ingestão hídrica, a ingestão de um paciente bem controlado deve manter-se dentro dos limites de normalidade (i.e. 40-70 mL/kg/24h), sendo que ingestão maior que 100 mL/kg/24h representa polidipsia presente (NELSON, 2004).

É interessante que o proprietário de um paciente diabético tenha em casa um glicosímetro portátil para realizar mensurações de glicemia antes da aplicação de

insulina, quando suspeitar de episódios hipoglicêmicos, ou até mesmo realizar curvas glicêmicas seriadas em casa (CASELLA *et al.*, 2003). Os glicosímetros humanos são confiáveis em sua maioria na avaliação da glicemia de cães, não afetando consideravelmente a tomada de decisões. Apesar disso, estes aparelhos podem gerar leituras mais baixas ou mais altas de glicose em comparação a um método de referência, sendo leituras mais baixas mais frequentemente detectadas, além de que variações no hematócrito do paciente também podem trazer interferência na análise (PAUL *et al*., 2011; BEHREND, 2006). Os melhores locais para obtenção de gotas de sangue, são vasos sanguíneos da pina (pode ser dolorido e necessário aquecer a orelha antes para promover vasodilatação), ou mais facilmente da mucosa labial utilizando as lancetas que acompanham o glicosímetro. Ao usar amostras obtidas a partir da mucosa labial, atenção a diluição da amostra com saliva, o que pode ser evitado com uma simples fricção do lábio com um algodão seco. A documentação isolada de glicemia só tem valor na detecção de uma hipoglicemia. Hiperglicemias *per se* não indicam um descontrole, uma vez que excitabilidade, estresse de coleta ou "síndrome do jaleco branco" podem provocar elevações na glicemia do paciente, especialmente se o histórico e sinais suportam a idéia de um bom controle glicêmico em casa. A alternativa nestes casos pode requerer dosagem de fructosamina sérica para avaliar esta situação (FELDMAN & NELSON, 2004).

A fructosamina é resultado da união estável, irreversível e não enzimática de proteínas plasmáticas com a glicose, principalmente a albumina, formando glicoproteínas. Desta forma, quanto maior a glicemia nas ultimas semanas, maior a concentração de fructosamina e vice-versa. Além disso, a fructosamina é um teste barato, não influenciado por variações momentâneas de glicemia e associada às informações clínicas do paciente é um excelente método de monitoramento de longo prazo (FLEEMAN & RAND, 2001, LOSTE & MARCA, 2001). Ao solicitar a determinação sérica de fructosamina, é importante avaliar a albuminemia (hipoalbuminemia reduz a concentração de fructosamina), bem como solicitar jejum, pois apesar deste metabólito não sofrer aumentos em decorrência de hiperglicemia pós-prandial, a hipertrigliceridemia (> 150 mg/dL) pode interferir negativamente nos resultados (NELSON, 2004). Os valores considerados referência para fructosamina (225 – 370 µmol/L) são valores tidos como normais para cães não diabéticos. Animais diabéticos com controle glicêmico excelente devem manter valores de fructosamina

entre 350 – 400 µmol/L, sendo que valores menores de 300 µmol/L são compatíveis com hipoglicemia crônica, valores entre 400 – 450 µmol/L são associados a um controle bom, valores entre 450 -500 µmol/L são associados a um controle razoável, e valores maiores que 500 µmol/L são associados a um controle ruim (FELDMAN E NELSON, 2004). Vale lembrar que pacientes recém-diagnosticados podem ter valores normais até maiores que 500 µmol/L dependendo do tempo de progressão dos sintomas.

3.2.12.1 Curvas glicêmicas seriadas

Uma vez estabelecida necessidade de ajustes na terapia insulínica após revisão dos dados de história e exames clínicos, alterações no peso corporal e concentração de fructosamina sérica, uma curva glicêmica seriada deve ser realizada com intuito de prover diretrizes para ajustes racionais na terapia insulínica (FELDMAN & NELSON, 2004). As avaliações dos dados de anamnese, exame clínico, variação no peso corporal e concentração de fructosamina permitem reduzir a frequência de realização de curvas glicêmicas seriadas, desta forma, reduzindo o número de venipunções e o tempo de permanência do animal no hospital ou clínica; minimizando assim a aversão e estresse do paciente a este tipo de procedimento, permitindo que curvas glicêmicas seriadas, quando necessárias, apresentem resultados mais significativos (NELSON, 2004). Apesar de já estarem disponíveis sistemas de monitoramento contínuo de glicemia para animais, estas novas tecnologias ainda estão distantes das rotinas clínicas (WIEDMEYER & DeCLUE, 2008; DAVISON, 2012). Contudo, estes sistemas de monitoramento contínuo de glicemia são interessantes por permitirem a detecção de picos curtos de hipoglicemia, as vezes não detectáveis nas curvas tradicionais. Em contra-partida, a necessidade de calibração frequente dos aparelhos, diminui a praticidade de seu uso rotineiro (WIEDMEYER & DeCLUE, 2008; FLEEMAN, 2011).

Para realização de uma curva glicêmica seriada em ambiente hospitalar, solicita-se que o cliente mantenha o horário de administração da insulina e refeição, e traga o cão o mais cedo possível pela manhã. Realiza-se a primeira medida de glicose, e então se repete as coletas a cada 2 horas até a próxima aplicação de insulina, sendo que as amostras de sangue podem ser obtidas preferencialmente de um cateter

heparinizado na veia cefálica ou jugular, por venipunção direta com agulha fina, ou ainda por meio do uso do lancetador de um glicosímetro (FLEEMAN & RAND, 2001). É interessante evitar erros de interpretação decorrentes de anorexia de internamento ou administração da insulina em horário não habitual. Se houver dúvida sobre a técnica de aplicação de insulina do proprietário, pode-se pedir que ele administre a insulina em nossa presença, ou mimetize aplicação usando solução salina, usando sua própria seringa. Todo procedimento deve ser cautelosamente monitorado (FELDMAN & NELSON, 2004). Em alguns casos, os glicosímetros portáteis usados para verificar a glicemia, podem indicar um melhor controle glicêmico do que realmente existe, ou, acusar hipoglicemia quando na verdade não há, como decorrência dos resultados relativamente menores de glicemia obtidos com este tipo de tecnologia quando comparado com a química tradicional (NELSON, 2004). O AlphaTRAK® (Abbott) é um glicosímetro desenvolvido e validado para uso em animais, reduzindo erros de interpretação induzidos pelo aparelhos, porém não esta disponível no mercado nacional (DAVISON, 2012).

Os valores mais importantes na avaliação dos resultados de uma curva glicêmica seriada são o nadir (menor leitura obtida) e as glicemias pré-insulina (FLEEMAN & RAND, 2000). Outras vantagens da mensuração a cada uma ou duas horas é a identificação do tempo para o pico de ação da insulina, duração do efeito da insulina e severidade de flutuação na glicemia (NELSON, 2004). Ajustes na insulinoterapia baseados somente em uma ou duas mensurações de glicose não fornecem dados para avaliação do efeito de determinada insulina, além de predisporem a episódios de hipoglicemia e efeito Somogyi (FELDMAN & NELSON, 2004).

Para as curvas realizadas em clínicas ou hospitais, é aconselhável que o estresse para o animal seja o menor possível para minimizar os efeitos do estresse da ida ao centro clínico no dia da realização da curva (FELDMAN & NELSON, 2004). O estresse promovido pela internação pode causar hiperglicemia e antagonismos aos efeitos da insulina, não permitindo uma correta avaliação da resposta glicêmica do paciente (FLEEMAN & RAND, 2000). Desta forma acredita-se que as curvas realizadas em casa refletem com maior acuidade a eficácia da terapia insulínica do que as curvas realizadas no hospital, uma vez que assim se elimina o estresse da internação assim como a reduzida atividade decorrente do internamento e a inapetência decorrente da ansiedade. Um bom controle da doença e dos sinais clínicos é obtido

quando a glicose se mantem dentro de uma variação de 90 a cerca de 250 mg/dL durante o dia, lembrando que as glicemias mais elevadas devem ocorrer próximo aos horários de aplicação da insulina (FLEEMAN & RAND, 2001; FELDMAN & NELSON, 2004; DAVISON, 2012).

3.2.12.2 Interpretação das curvas glicêmicas

É importante lembrar sempre de interpretar os resultados de curvas glicêmicas em conjunto com a avaliação clínica, anamnese e concentração de fructosamina e alterações no peso corporal (BEHREND, 2002). Utiliza-se basicamente os valores do nadir (menor glicemia detectada), e os valores de glicemia pré-aplicação de insulina para definir ajustes racionais (FLEEMAN & RAND, 2001). O tempo para o nadir é importante na determinação da dose, porém pode variar consideravelmente de um dia para outro. A glicemia pré-insulina é útil na verificação da sobreposição do efeito de duas doses de insulina.

Diretrizes práticas para interpretação de curvas glicêmicas seriadas (FLEEMAN & RAND, 2001):

- Redução na dose de insulina em 50% se o nadir for menor que 55 mg/dl, ou caso o paciente apresente sinais de hipoglicemia;

- Redução na dose de insulina em 20% se o nadir estiver entre 55 e 90 mg/dl, ou se a glicemia pré-insulina estiver menor que 180 mg/dl;

- Não aplicar insulina se a glicemia pré-insulina estiver menor que 90 mg/dl, mandar o animal para casa alimentando-se normalmente e no outro dia pela manhã re-iniciar insulinoterapia com uma dose 20% menor;

- Excelente controle glicêmico com nadir entre 90 e 145 mg/dL, e glicemia pré-insulina maior que 180 mg/dl. Não mexer na dose de insulina;

- Aumentar a dose de insulina em 20% se o nadir for maior que 145 mg/dL e as glicemias pré-insulina forem maiores que 180mg/dL;

- Em animais não letárgicos, com peso estável, não cetonúricos e ingerindo menos de 60 ml/kg/dia, onde houve indicação de alteração na dose de insulina para mais ou para menos, esta alteração deve ser de apenas 1 unidade independente da dose atual.

Outra consideração importante é que curvas glicêmicas seriadas e medidas isoladas de glicose não são confiáveis em animais agitados, nervosos ou agressivos em decorrência de hiperglicemia por estresse (FELDMAN & NELSON, 2004). Após algum ajuste de dose de insulina, deve-se evitar repetir uma curva glicêmica seriada em dias consecutivos, pelo risco de gerar hiperglicemia de estresse, e também pelo fato de que o organismo responderá melhor a nova dose após alguns dias do ajuste. Curvas glicêmicas tendem a ser extremamente variáveis, e irreprodutíveis, dia após dia refletindo a enorme variedade de fatores que interferem na glicemia (FLEEMAN & RAND, 2003), o que pode atrapalhar ou confundir a avaliação de curvas de pacientes que estão clinicamente bem controlados. Medidas de controle como a automonitorização para ajustes da dose de insulina dia-a-dia usadas em humanos não se aplicam a cães, sendo a avaliação clínica muito mais importante no controle do paciente. Neste sentido as curvas glicêmicas seriadas são utilizadas quando se identifica a necessidade de mudanças no regime terapêutico (NELSON, 2004).

A avaliação do tempo de duração do efeito da insulina é uma informação importante, pois pode indicar duração de efeito curto ou duração de efeito prolongado. Tipicamente o nadir ocorre com 8 a 10 horas após aplicação de insulina. Um nadir muito precoce indica duração curta do efeito, e um nadir ocorrendo 12 ou mais horas após aplicação indica duração prolongada do efeito, o que pode predispor a hipoglicemia e efeito Somogyi (discutido adiante). A avaliação do período de duração do efeito da insulina permite escolha mais racional do tipo de insulina a ser usado (DAVISON, 2012). A recomendação frente à identificação de uma ação curta é a troca da insulina NPH para uma de ação lenta (p.ex. glargina), ou iniciar um manejo de aplicações da NPH a cada 8 horas, o que pode ser trabalhoso e complicado. Em contrapartida, a identificação de um efeito de ação prolongada, sugere a realização de uma curva de 24 horas, mantendo somente a aplicação de insulina pela manhã, e as refeições nos horários programados, com objetivo de avaliar a duração do efeito da insulina. Frente a isto, caso se identifique um efeito de duração menor que 16 horas, pode-se reduzir a dose da insulina noturna, ou ainda trocar o tipo de insulina para uma de ação mais rápida (p.ex. troca de glargina para NPH, ou troca da NPH para uma 70% NPH / 30% regular) aplicada a cada 12 horas. Outra possibilidade neste panorama, é manter a insulina lenta ou NPH aplicada uma vez por dia, com uma aplicação de uma dose menor de insulina regular antes de o paciente ir dormir (16 a 18 horas após

aplicação da manhã), com objetivo de manter um bom controle ao longo de 24 horas, porém usando insulinas diferentes (NELSON, 2004).

A resistência à insulina é caracterizada por valores glicêmicos extremamente aumentados (>500 mg/dl), e normalmente é causada por doenças intercorrentes ou medicamentos. Doses de insulina entre 1 e 1,5 U/kg não efetivas em promover redução da glicemia também devem ser considerados casos de resistência (HESS, 2010). Um valor inicial de glicemia elevado, seguido por uma boa resposta à insulina, sugere um aumento na produção de glicose após um episódio hipoglicêmico, estresse transitório ou aumento na atividade muscular, uma vez que severos episódios de hipoglicemia resultam em hiperglicemia compensatória (FLEEMAN & RAND, 2001).

Um adequado controle glicêmico é frequentemente obtido em menos de 2 meses de visitas regulares e ajustes na insulinoterapia. Um período de lua de mel após início da terapia insulínica é descrito em cães e humanos diabéticos, e é caracterizado por excelente controle glicêmico com baixas doses de insulina, que com o tempo vão se tornando inefetivas. Isto é explicado pela existência de células beta secretoras de insulina funcionais no começo do tratamento, apresentando um sinergismo com a terapia insulínica. Uma vez que estas células tornam-se não funcionais a dose de insulina exógena precisa ser aumentada (FELDMAN & NELSON, 2004).

3.2.13 Complicações da terapia insulínica

As principais complicações na terapia insulínica podem ser relacionadas tanto ao cliente (p.ex. técnica ruim, não cumprimento dos horários, ajustes voluntários de dose), ao animal (p.ex. anticorpos anti-insulina, fatores de resistência à insulina, mudanças no perfil de absorção da insulina), ou ainda ao veterinário, como no caso p.ex. da não identificação da ocorrência de um fenômenos Somogyi, associado a aumentos progressivos na dose de insulina (TRAPO & NETA, 2005).

3.2.13.1 Hipoglicemia

A severa hipoglicemia resultante de uma sobredose de insulina pode causar danos cerebrais irreversíveis e morte. Os sinais clínicos de neuroglicopenia incluem fraqueza, agitação, andar acelerado ou cambaleante, perda de força nos membros. Casos mais graves evoluem para ataxia, cegueira, tremores, taquicardia, convulsões,

desmaios e coma. Contudo, frequentemente a hipoglicemia não provoca sinais clínicos no paciente, fenômeno chamado de hipoglicemia inconciente (WHITLEY *et al.*, 1997). Isto ocorre uma vez que na maioria dos casos onde os animais estão expostos a hipoglicemia, o sistema nervoso central tem tempo para se adaptar a estas baixas concentrações, não desencadeando respostas compensatórias secundárias a neuroglicopenia. No entanto, quedas bruscas de glicemia podem desencadear crises mais facilmente (CHERRINGTON, 2008). Somente cerca de 30% dos pacientes hipoglicêmicos manifestam algum sinal clínico, sendo que a sobredose de insulina só é identificada muitas vezes quando se detecta baixas concentrações de fructosamina (< 300 µmol/L na presença de normoalbuminemia), hipoglicemia em uma curva glicêmica seriada, ou após uma crise.

Episódios graves de hipoglicemia podem ocorrer em cães diabéticos que recebem mínimo controle de glicemia durante meses, por apresentarem sinais de bom controle glicêmico (FLEEMAN & RAND, 2001). O risco de hipoglicemia é maior quando os cães recebem insulina uma vez por dia, ao invés de duas (HESS & WARD, 2000), e quando apresentam um bom controle glicêmico, resultando em baixos valores de glicemia na hora da aplicação de uma nova dose de insulina (FLEEMAN & RAND, 2001). Também existe uma variedade de fatores médicos e de manejo que podem resultar em sobredose, incluindo incompleta mistura da suspensão de insulina, administração de insulina em intervalos irregulares, inapetência, aumento súbito na dose de insulina sem indicação, exercício excessivo e melhora na sensibilidade à insulina associada ao fim do diestro ou tratamento de doenças concomitantes como o hiperadrenocorticismo (DAVISON 2012).

Qualquer pessoa na casa de um paciente diabético deve saber reconhecer os sinais clínicos de hipoglicemia, que pode se tornar letal. Se sinais leves de hipoglicemia forem perceptíveis, o proprietário deve servir uma refeição da comida usual do cão. Se o cão estiver sem vontade de comer ou incapaz de alimentar-se se administrar um xarope por via oral com alta concentração de glicose ou então, açúcar espalhado na mucosa oral. Tão logo o cão tenha melhorado, o animal deve comer imediatamente uma refeição, e o veterinário deve ser contatado. Usualmente recomenda-se então uma redução de 25 a 50% na dose de insulina, com ajustes sub-seqüentes de acordo com a resposta clínica e mensurações de glicose. Caso o veterinário não tenha sido contatado até o horário da próxima aplicação de insulina,

esta dose não deve ser aplicada (NELSON, 2004; FELDMAN & NELSON, 2004). Pacientes com diabetes transitório poderão manifestar a remissão através de uma hipoglicemia persistente, mesmo após reduções sucessivas da dose de insulina (FELDMAN & NELSON, 2012).

3.2.13.2 Persistência ou Recorrência dos Sinais Clínicos

A persistência ou recorrência dos sinais clínicos de DM, como poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso são consideradas as complicações mais comuns do tratamento com insulina, e normalmente são decorrentes de problemas na técnica de administração do proprietário, ou são problemas inerentes ao tipo de insulina (curta duração do efeito), dose insuficiente, espécie da qual provém a insulina, frequência de administração; ou ainda estão relacionadas à efetividade do hormônio, que esta sofrendo antagonismo em decorrência de inflamações, infecções, neoplasias ou desordens hormonais intercorrentes (HESS, 2010, DAVISON, 2012). Todas estas causas devem ser criteriosamente investigadas antes de se tomar qualquer decisão a respeito da terapia insulínica (FLEEMAN & RAND, 2001).

A inadequada absorção de insulina não é uma complicação comum da aplicação subcutânea, a menos que o paciente esteja desidratado, quando então existe uma redução no fluxo sanguíneo periférico, reduzindo a mobilização de insulina do seu sítio de aplicação (NELSON, 2004). Outra possibilidade de menor absorção local, é aplicação sempre no mesmo local, o que pode provocar lipodistrofia local, e reduzida absorção de insulina. Reações alérgicas no local da injeção são incomuns em cães, mas quando ocorre, a inflamação e edema local prejudicam a absorção de insulina, sendo então indicado variar o local das aplicações, trocar a espécie de insulina por uma mais homóloga, no caso pela insulina suína, e também por uma preparação mais purificada, como a insulina cristalina regular.

3.2.13.3. Efeito Somogyi (Rebote Hiperglicêmico)

O efeito Somogyi, ou rebote hiperglicêmico, é um fenômeno decorrente de uma sobredose de insulina com consequente hipoglicemia (FELDMAN & NELSON, 2004). Caracteriza-se por um fenômeno fisiológico em resposta a uma redução muito

rápida da glicemia independente do nadir, ou então, em resposta a uma glicemia menor que 65 mg/dL. Nestas situações são estimulados diversos mecanismos fisiológicos que interferem com o efeito da insulina, e estimulam a produção de glicose hepática, principalmente a liberação de adrenalina e glucagon, os quais não só estimulam a produção de glicose como também diminuem a utilização periférica de glicose (NELSON, 2004). Dependendo da intensidade da hipoglicemia, ou velocidade de redução da glicemia cortisol e GH passam a ser secretados também, mantendo a resposta hiperglicêmica iniciada pelo glucagon e adrenalina. Desta maneira observa-se após o episódio hipoglicêmico, eventualmente na manhã seguinte, uma marcada hiperglicemia (400 a 800 mg/dL) com glicosúria. Frequentemente o proprietário não observa sinais de hipoglicemia que tenham provocado tal resposta (DAVISON, 2012).

A terapia para o fenômeno Somogyi envolve a redução na dose de insulina em 10 a 25% (reduzir 1 a 5U), ou em alguns casos, deve-se reiniciar a terapia insulínica com 0,25 U/kg BID. A reavaliação do paciente é recomendada para ser feita após 3 a 7dias, uma vez que, este fenômeno pode induzir resistência à insulina por um período de 24 a 72 horas (NELSON, 2004). Nestes casos, questiona-se o proprietário sobre a melhora clínica do animal. Caso não tenha havido melhora, pode-se seguir com uma redução gradual da dose, ou re-começar com uma dose de 0,25 U/kg. No entanto, se após redução da dose o cliente informar piora da poliúria e polidipsia, sobredose de insulina passa a ser uma causa menos provável para o descontrole, devendo-se pesquisar outras causas (FELDMAN & NELSON, 2004).

A duração prolongada do efeito da insulina, com sobreposição de efeito entre uma dose e outra, assim como ajustes na dose de insulina baseado na glicosúria matinal pelos proprietários são fatores frequentemente envolvidos na ocorrência do fenômeno Somogyi, o qual deve ser suspeitado em qualquer animal demonstrando deficiente controle glicêmico, e/ou com elevadas concentrações séricas de fructosamina (FELDMAN & NELSON, 2004). Do ponto de vista de avaliação glicêmica, é fácil suspeitar de Somogyi naqueles pacientes que historicamente alternam glicemias menores que 80 mg/dL com glicemias maiores que 300 mg/dL frente a mesma dose de insulina. Outro indicativo da ocorrência de Somogyi é naqueles pacientes que exibem curvas glicêmicas que começam com valores elevados (p.ex. 400 mg/dL) e após 2-3 horas da aplicação da insulina reduzem para 100 mg/dL, por exemplo. Nestes pacientes, frequentemente o problema é um efeito retardado da

insulina, fazendo com que após aplicação da insulina à noite, ocorra hipoglicemia seguida de Somogyi provocando hiperglicemia matinal. Apesar de relativamente imprevisível, frequentemente estes animais apresentam valores de fructosamina bastante elevados, indicando um descontrole do tratamento (FLEEMAN & RAND, 2003).

Um efeito Somogyi é difícil de ser demonstrado através de curvas glicêmicas seriadas, apesar de este ser o melhor método para identificá-lo enquanto os monitores de glicemia contínuos não se popularizam (FLEEMAN, 2011). Caso uma curva seja realizada no dia de ocorrência do fenômeno, ficará clara uma hipoglicemia seguida de hiperglicemia, ou uma queda brusca na concentração de glicose provocando hiperglicemia após. Contudo, como este efeito hiperglicemiante associado à secreção de hormônios antagônicos à insulina pode durar por dias, nos dias seguintes a ocorrência do fenômeno, as curvas glicêmicas seriadas podem somente mostrar a existência de um quadro de resistência, que vai lentamente diminuindo até nova ocorrência de hipoglicemia (NELSON, 2004).

3.2.13.4 Anticorpos Anti-insulina

A produção de anticorpos anti-insulina em cães diabéticos apresenta um impacto deletério na efetividade da insulina, prejudica o controle glicêmico e em casos extremos provoca severa resistência à insulina, apesar de alguns animais com anticorpos anti-insulina manterem-se estáveis (DAVISON, 2008). A presença destes anticorpos também apresenta a capacidade de causar flutuações erráticas e imprevisíveis na glicemia (FELDMAN & NELSON, 2004). Anticorpos contra insulina podem afetar a farmacocinética da insulina exógena administrada por diversos mecanismos, como, por exemplo, prejudicando a farmacodinâmica como um carreador ou inibindo seu efeito por neutralização. Estes anticorpos desenvolvem-se em alguns animais após início da terapia insulínica em resposta a aplicações repetidas do hormônio para promover o controle glicêmico. No entanto, alguns animais não desenvolvem estes anticorpos, provavelmente devido à indução de tolerância do sistema imune a proteína exógena que esta sendo administrada diariamente (DAVISON, 2008). A estrutura e a sequência de aminoácidos da insulina injetada influenciam a formação de anticorpos, embora a conformação estrutural dos epítopos

da molécula pareça ser mais importante do que a simples sequência de aminoácidos (FELDMAN & NELSON, 2004). Apesar de incomum, anticorpos anti-insulina devem ser suspeitados em cães com pobre controle glicêmico onde a causa para tal não é identificada. Em cães a insulina suína é a menos antigênica por apresentar uma sequência de aminoácidos idêntica a da insulina canina. A insulina humana difere em apenas um aminoácido, enquanto a bovina difere em dois sendo a mais imunogênica e menos indicada para uso em cães diabéticos (BEHREND, 2002).

3.2.14.5 Resistência Insulínica

A resistência insulínica é uma condição na qual uma quantidade normal de insulina produz uma resposta biológica subnormal, e pode ser decorrente de problemas antes da interação da insulina com seu receptor, problemas no receptor, ou ainda problemas nas cascatas fosforilativas pós-receptor (FELDMAN & NELSON, 2004). Os defeitos pré-receptor são decorrentes de redução na quantidade de insulina metabolicamente ativa, incluindo aumento na degradação da insulina e anticorpos anti-insulina. Os defeitos de receptor incluem decréscimo na concentração de receptores de insulina na membrana plasmática ou menor afinidade de ligação hormônio-receptor, ambas levando a redução na atividade tirosina quinase do receptor. Os defeitos pós-receptor, incluem reduzida concentração e fosforilação de IRS-1 e IRS-2, fosfatidilinositol 3-OH quinase, mutações nos transportadores de glicose, alterações tecido-específicas na produção de GLUT-4, defeitos na translocação intracelular de GLUT-4 ou ainda defeitos na vias de sinalização e enzimas intracelulares (SALTIEL & KAHN, 2001; MORI *et al.*, 2009a). Apesar de desconhecer-se o papel de alterações nos receptores ou pós-receptor na DMC, foi demonstrada alterações na concentração e afinidade dos receptores de insulina em cadelas em estro, diestro ou com hiperplasia endometrial cística piometra (PÖPPL *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado por Mori *et al*. (2009b) que uma adequada terapia insulínica promove uma melhor expressão de genes ligados a sinalização intra-celular da insulina, servindo como indicadores de resistência à insulina em cães diabéticos.

Considera-se a ocorrência de resistência insulínica quando ocorrem altas glicemias com pouca redução após administração de insulina, e que pode estar sendo causada por doença intercorrente ou medicações (HESS, 2010). A resistência à

insulina também pode ser suspeitada quando não se consegue reduzir a glicemia a valores abaixo de 300 mg/dl, mesmo com doses de insulina superiores a 1,5 U/kg em uma curva glicêmica seriada, assim como quando o controle glicêmico é errático e há necessidade de constantes alterações na dose de insulina dentro semanas na tentativa de manter o adequado controle glicêmico (FELDMAN & NELSON, 2004). É importante ressaltar que hiperglicemia por estresse, fenômeno Somogyi e problemas com a terapia insulínica e doenças intercorrentes também podem levar a resistência insulínica. Em cães não diabéticos onde esta se investigando a ocorrência de resistência a insulina, pode-se aplicar fórmulas simples, como o índice insulinogênico, que correlaciona a insulinemia e glicemia (II = Insulinemia (µU/mL) / Glicemia (mg/dL), sendo que valores maiores que 0,25 sugerem uma hiperinsulinemia relativa. Além deste, outros índices de sensibilidade à insulina podem ser utilizados com este fim (PÖPPL *et al.,* 2009).

De uma forma geral, qualquer moléstia inflamatória, neoplásica, infecciosa ou hormonal pode gerar um quadro de resistência à insulina (FELDMAN & NELSON, 2004). As causas mais comuns em cães de resistência à insulina secundária a doenças foram identificadas como as seguintes: hiperadrenocorticismo, infecções urinárias, pancreatite, hipotireoidismo, pioderma, infecções respiratórias, obesidade, hiperlipidemia, diestro, piometra, periodontite severa e insuficiência renal (HESS, 2010). Desta forma, é interessante pesquisar estas possíveis causas de resistência frente às pacientes com dificuldades de controlar a glicemia com dose de insulina menor que 1U/kg. O tratamento é voltado contra a doença que esta provocando resistência, e desta forma, espera-se que uma dose de insulina antes ineficaz passe a ser eficiente à medida que for controlada a doença subjacente. Ajustes na insulinoterapia são necessários antes (aumento de dose) e após resolução do quadro de resistência (redução da dose) obviamente, a fim de se evitar complicações como cetoacidose e hipoglicemias, respectivamente.

3.2.15 Complicações crônicas da DMC

As complicações resultantes do diabetes mellitus (cataratas), ou do tratamento (hipoglicemia) são bastante comuns em cães, sendo a cegueira decorrente de uveíte anterior devido à formação de cataratas a mais comum. A pancreatite

crônica, infecções recorrentes no trato urinário, trato respiratório e pele também são frequentemente observados (DAVISON, 2012). Os pacientes diabéticos são mais suscetíveis à quadros infecciosos, uma vez que os neutrófilos e outras células do sistema imune não mantem adequada capacidade de quimiotaxia, adesão e fagocitose frente a hiperglicemia e deficiência insulínica (LATIMER & MAHAFFEI, 1984), além do quadro diabético poder estar associado a menor contagem de linfócitos T ($CD3^+$), linfócitos T helper ($CD4^+$), linfócitos B ($CD21^+$) além de menor relação CD4/CD8 na periferia (MORI *et al*., 2008b) mesmo sob terapia insulínica. Outras complicações crônicas do diabetes, como retinopatia diabética, neuropatia diabética, angiopatia diabética, miocardiopatia diabética, coagulopatia diabética, dentre outras, são mais comuns em humanos diabéticos por décadas, não sendo problemas comuns em cães diabéticos (NELSON, 2004). No entanto, a neuropatia diabética, comum na espécie felina, eventualmente pode ser documentada em cães (MORGAN *et al*., 2008).

3.2.15.1 Cataratas

Dentre as doenças metabólicas e sistêmicas, o DM é a que mais frequentemente leva a formação de cataratas. A formação de catarata diabética normalmente é rápida e bilateral, com ou sem terapia insulínica, começando logo após o começo do desequilíbrio metabólico (PLUMMER *et al.*, 2007). Esta é a considerada a complicação crônica mais comum em cães diabéticos, tendo sido identificada em 66% de uma população de 200 cães diabéticos, e com maior incidência nas raças Poodle e Schnauzer (BEAM *et al*., 1999). A formação de cataratas é um processo irreversível uma vez que tenha iniciado, e isto pode ocorrer com muita rapidez, o que está diretamente ligado ao grau de hiperglicemia (DAVISON, 2012). Clinicamente os cães podem evoluir de uma visão normal para a cegueira em um período de dias, meses ou anos (FELDMAN & NELSON, 2004).

O metabolismo normal do cristalino é mantido por transporte facilitado de glicose e outros metabólitos, que penetram livremente na lente a partir do humor aquoso. A concentração normal de glicose no cristalino é de cerca de 10% a concentração no humor aquoso. Dentro do cristalino a glicose é convertida de forma anaeróbica pela enzima hexoquinase em ácido láctico, que pode sair livremente da lente. No entanto este sistema é facilmente saturado por altas concentrações de glicose,

passando a utilizar a via do poliol. A alta concentração de glicose no cristalino aumenta a atividade da enzima aldose redutase, que reduz a glicose a sorbitol, que então é convertido a fructose, pela enzima sorbitol desidrogenase. Como o sorbitol (álcool) e a fructose (aldeído) não são livremente permeáveis na membrana celular, e atuam como potentes agentes hidrofílicos, ocorre um aporte de água para dentro do cristalino, causando um inchaço e rompimento das fibras das lentes, formando a catarata com aspecto de linhas de suturas em Y na estrutura das lentes, típica da DMC (PLUMMER *et al.*, 2007).

Um bom controle glicêmico e flutuações mínimas de glicemia ajudam a evitar e atrasar a ocorrência de cataratas, e cães com problemas em estabelecer tal controle estão sob risco de desenvolver o problema. No entanto, praticamente todos os cães diabéticos irão desenvolver cataratas ao longo dos meses/anos de tratamento. Uma vez que o animal está cego em decorrência do processo, a necessidade de um rigoroso controle glicêmico não é mais necessária (NELSON, 2004). A visão é recuperada em 75 a 80% dos cães submetidos à remoção das cataratas, sendo que fatores como controle glicêmico, atrofia e degeneração retiniana e a presença de uveíte induzida pela catarata afetam o sucesso da cirurgia (BAGLEY & LAVACH, 1994).

3.2.15.2 Uveíte Induzida pelo Cristalino

Durante a formação da catarata e posterior reabsorção, as proteínas das lentes são expostas ao sistema imune local ocular, resultando em inflamação e uveíte. O tratamento desta alteração consiste na diminuição da reação inflamatória e prevenção da ocorrência de danos intra-oculares (BAGLEY & LAVACH, 1994). Os corticosteróides oftálmicos são as drogas mais comumente utilizadas no tratamento de inflamações oculares. No entanto estas preparações podem ser absorvidas sistemicamente e causar antagonismo à insulina interferindo no controle glicêmico, especialmente em cães toys e miniaturas. Como alternativa menos potente, porém sem interferências no controle glicêmico, pode-se utilizar antiinflamatórios oftálmicos não esteroidais ou ciclosporina (FELDMAN & NELSON, 2004).

3.2.15.3 Hipertensão Sistêmica

A diabetes é uma causa comum de hipertensão em humanos e em animais, sendo que o mecanismo parece estar associado a uma vasculopatia e aumento da resistência vascular periférica (NOVELLAS *et al*., 2008). Possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento de hipertensão em cães diabéticos incluem distúrbios no metabolismo de lipídios, levando a redução na complacência vascular e a hiperfiltração glomerular generalizada. Em cães, a hipertensão sistêmica é um achado comum em até 50% dos casos, observando-se uma associação entre a hipertensão, a duração do diabetes e aumento na relação albumina-creatinina na urina, sendo que a pressão diastólica e pressão sangüínea média eram maiores em cães com maior duração da doença (FELDMAN & NELSON, 2004; MAZZI *et al*., 2008). No entanto, nenhuma relação pode ser determinada entre controle glicêmico e pressão sanguínea. Indica-se início de tratamento naqueles casos com pressão arterial consistentemente maiores que 160 mmHg (NELSON, 2004).

3.2.15.4 Nefropatia Diabética

A nefropatia diabética em cães é um fenômeno raro, e as anormalidades histológicas encontradas incluem glomerulonefropatia membranosa com fusão dos processos podais, engrossamento de membrana basal de glomérulos e túbulos, aumento no material da matriz mesangial, presença de depósitos subendoteliais, fibrose glomerular e glomeruloesclerose (FELDMAN & NELSON, 2004). A anormalidade inicial pode ser a hipertensão glomerular crônica e hiperperfusão renal decorrentes da hiperglicemia crônica. Assim o aumento na pressão glomerular resulta no depósito de proteínas no mesangio. A expansão do mesangio invade o espaço subendotelial reduzindo o lúmen dos capilares glomerulares, o que leva a um declínio na taxa de filtração glomerular, o que leva no final a glomeruloesclerose e insuficiência renal (FELDMAN & NELSON, 2004). Cães com mais de dois anos de doença que tenham uma glicemia fracamente controlada podem sofrer esclerose glomerular.

A nefropatia diabética apresenta-se normalmente com alterações tipo proteinúria grave (albuminúria), devido à disfunção glomerular, progredindo conforme o dano glomerular a ocorrência de azotemia e uremia. No ápice de desenvolvimento da fibrose glomerular ocorre insuficiência renal oligúrica e anúrica. Não há tratamento

específico para a nefropatia diabética além de adequado controle glicêmico, manejo médico conservativo da insuficiência renal e controle da hipertensão sistêmica (FELDMAN & NELSON, 2004).

3.2.16 Prognóstico

Em geral o prognóstico para cães diabéticos depende em parte do compromisso do proprietário em tratar a doença, facilidade de controlar a glicemia e a presença e reversibilidade de doenças intercorrentes, assim como de evitarem-se as complicações crônicas associadas à doença (APTEKMANN & SCHWARTZ, 2011). Pacientes com diabetes vivem em média dois a três anos (NELSON, 2004), porém os que sobrevivem aos primeiros seis meses podem facilmente viver mais que cinco anos com a doença se houver adequado cuidado dos proprietários, avaliações frequentes pelo veterinário, além de uma boa comunicação entre os proprietários e o clínico. Desta forma, cães diabéticos podem viver vidas relativamente normais, a diabetes *per se* não reduz a expectativa de vida desde que se mantenha um rígido controle glicêmico (FELDMAN & NELSON, 2004).

3.2.17 Perspectivas futuras

Trabalhos recentes tem demonstrado que a terapia gênica poderá num futuro não muito distante ser aplicada na prática clínica. Ayuso *et al*. (2006) demonstraram que vetores criados a partir de adenovírus são capazes de transmitir genes de interesse em células pancreáticas caninas *in vivo*, sem prejuízo as funções do órgão, ao passo que Niessen *et al*. (2012b), demonstraram que células musculares estriadas caninas foram capazes de passar a produzir insulina em cultura após terem sido transfectadas com um plasmídeo não viral contendo o gene da insulina. Além disso, estudos no campo de transplantes de células β (EDAMURA, *et al.*, 2003), e desenvolvimento de biopâncreas artificiais para infusão de insulina vem sendo desenvolvidos (MATSUO *et al.*, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão desta Tese serão apresentados na forma de artigos e maniscritos científicos. Cada artigo foi formatado nas normas das revistas científicas às quais foram submetidos, conforme consta abaixo. Os comprovantes de envio, aceite, ou publicação quando for o caso encontram-se nos anexos. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um dos artigos, como descrito abaixo:

- Artigo 1. Diestro e diabetes mellitus canina: o que há de novo?

Publicado em MedVep – Revista Científica de Medicina Veterinária, Pequenos Animais e Animais de Estimação 2010 v. 8(27): 704-713. Comprovante em APÊNDICE II.

- Artigo 2. Diabetes mellitus remission after resolution of inflammatory and progesterone-related conditions in bitches

In Press na Research in Veterinary Science. Comprovante em APÊNDICE III

- Manuscrito 3. Analytic accuracy of risk factors for canine diabetes mellitus and survival after its diagnosis.

Submetido para publicação na Research in Veterinary Science. Comprovante em APÊNDICE IV.

- Manuscrito 4. A matched case-control study on canine diabetes mellitus risk factors.

Submetido para publicação na Journal of Small Animal Practice. Comprovante em APÊNDICE V.

- Manuscrito 5. Insulin resistance due to periodontal disease in an old diabetic female poodle.

Será submetido publicação na Journal of Veterinary Dentistry.

4.1 Artigo 1

DIESTRO E DIABETES MELLITUS CANINA: O QUE HÁ DE NOVO?

DIESTRUS AND CANINE DIABETES MELLITUS: WHAT´S NEW?

Alan Gomes Pöppl[1] & Gabriela Garcia Araujo[2]

1. Médico Veterinário, Residência (R1) em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Mestre em Fisiologia, Doutorando pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Acadêmica do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Endereço para contato: Rua Amapá, 1319, bairro Vila Nova, Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil. CEP: 91740-460. Telefone: 51 96684995. Email: gomespoppl@hotmail.com

DIESTRO E DIABETES MELLITUS CANINA: O QUE HÁ DE NOVO?

DIESTRUS AND CANINE DIABETES MELLITUS: WHAT´S NEW?

RESUMO

A diabetes mellitus canina é uma das doenças endócrinas mais comuns na prática veterinária. As fêmeas são mais acometidas do que os machos, sendo que a incidência da doença é maior durante o diestro, ficando claras as evidencias de que o diabetes mellitus em fêmeas caninas assemelha-se ao diabetes mellitus gestacional humano. Classicamente considera-se que as fêmeas são mais predispostas à diabetes em decorrência dos efeitos da progesterona e do hormônio do crescimento liberado pela glândula mamária em resposta a progesterona durante o diestro. Contudo, uma série de evidências vem demonstrando que outros fenômenos estão associados à resistência à insulina em cadelas durante o diestro, e que fatores moleculares, nutricionais, genéticos e auto-imunes também estão associados.

Palavras chave: resistência à insulina, ciclo estral, cadelas, diabetes gestacional.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus canino (DMC) é uma endocrinopatia bastante comum em cães. O estado diabético causa transtornos devido à poliúria e polidipsia, que tende a ser intensa, além da polifagia e perda de massa corpórea características da doença. Além disto, o risco de cetoacidose diabética, predisposição à infecções, e a perda de visão decorrente de catarata são outras complicações potenciais da doença (1). Em humanos diabéticos, a retinopatia diabética é uma complicação mais frequente que o surgimento de cataratas, contudo, na espécie canina a identificação e conhecimento sobre a prevalência e incidência de retinopatia diabética é pequena em virtude da rápida

evolução da opacificação do cristalino associado a formação da catarata diabética (2). Na espécie canina, o diabetes mellitus (DM) ocorre cerca de duas vezes mais em fêmeas (3), e na maioria destas pacientes, uma forma semelhante ao diabetes mellitus gestacional (DMG) humano pode ser caracterizada (4). Apesar da diversidade dos mecanismos até então conhecidos para a ocorrência de resistência à insulina durante o diestro canino (fase de predomínio da progesterona), novas evidências surgem sobre os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento da DMC.

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é revisar os principais mecanismos de resistência à insulina durante o diestro canino.

REVISÃO DE LITERATURA

O Diestro Canino

A cadela por apresentar ciclos estrais com duração de cerca de 7 meses é considerada uma espécie monoéstrica sazonal (1,5,6). Este ciclo estral é caracterizado por quatro fases distintas (pró-estro, estro, diestro e anestro) correspondendo ao período entre o começo de um estro e a nova ocorrência de estro. O intervalo interestral 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 (5,6).

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 ser fertilizados. O dia 10 normalmente é o primeiro dia do diestro (1,5). A secreção vaginal observada nesta fase pode apresentar glicose em decorrência da intolerância aos carboidratos induzida pela progesterona (1).

O diestro é definido como a fase de predomínio da progesterona onde a fêmea esta "fisiologicamente prenhe". 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 (6,7). 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 (1,5). 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 (8). 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 (1,9,10)

O aumento na concentração plasmática de prolactina aparece como um fator luteotrófico na segunda metade do diestro (5,7). O aumento da prolactina, associado com uma leve redução da progesterona estimula a lactação e galactorréia em muitas fêmeas caninas. Algumas fêmeas podem apresentar comportamento maternal, no qual adotam e protegem filhotes de outros cães, animais de outras espécies ou até mesmo objetos inanimados em um quadro clínico determinado de pseudociese (6,8). A hiperprolactinemia é reconhecida como uma causa de resistência à insulina na espécie

humana (1,12) e desta forma, apesar de não haver ensaios comerciais para prolactina canina que permitam uma investigação desta hipótese em cães, pode-se especular um eventual papel da prolactina na resistência a insulina observada durante o diestro em algumas cadelas.

Durante a fase lútea do ciclo, a progesterona promove e mantêm 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 (8). A duração do diestro normalmente fica entre 56 e 58 dias em fêmeas prenhes e de 60 a 100 dias em não prenhes (7).

Classificação e Etiologia do Diabetes Mellitus Canino

O DMC é uma doença crônica sistêmica decorrente de uma deficiência relativa ou absoluta de insulina. A doença é classificada basicamente de duas formas (13). A primeira é baseada na classificação em humanos (tipo I - juvenil e tipo II - senil) e considera mecanismos patofisiológicos e alterações patológicas das células β pancreáticas (14). A segunda forma de classificação considera a necessidade terapêutica da insulina para estabelecer o controle glicêmico, classificando o DM em dependente de insulina (DMID) ou DM não dependente de insulina (DMNID) (15).

O DM tipo I é caracterizado por uma combinação de suscetibilidade genética e destruição imunomediada das células β, com progressiva e muitas vezes completa deficiência de insulina (1). Acredita-se que em cães o DM progrida de forma semelhante, mas não é identificado antes dos estágios finais, quando a terapia insulínica é fundamental (14). O DM em cães jovens é um achado extremamente raro, de forma contrária a humanos diabéticos com DM tipo I (1,16). A média de idade no momento do diagnóstico é em torno de 9 anos (1,14-16,17) desta forma, acredita-se

que apesar de existirem evidencias de destruição imunomediada de células beta em cães diabéticos, propõem-se que o DMC seja mais semelhante a diabetes autoimune latente do adulto (*LADA – latent autoimmune diabetes of the adult*). A LADA em humanos é caracterizada por uma destruição imunomediada menos agressiva, lenta e progressiva das células β (4,18). Assim, tem-se proposto que a ocorrência de DM em cães com menos de seis meses esteja mais associada com defeitos congênitos do que com autoimunidade (18).

O DM tipo II ocorre por uma resistência periférica à insulina e por disfunção das células β (14). Fatores ambientais, como obesidade, podem acentuar o problema. Aumentos nas concentrações séricas de ácidos graxos livres na circulação portal induzem menor ação hepática da insulina, resultando em excesso de produção de glicose hepática e hiperglicemia pós-prandial persistente (19). 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 (p. ex. menor expressão dos receptores e de moléculas envolvidas na transdução do sinal da insulina ou ainda fosforilação do receptor e seus substratos em resíduos de serina ao invés de tirosina), assim como a reduzida secreção de insulina, a qual é um dos principais pontos da patogênese da intolerância à glicose no DM tipo II (1,20). Os pacientes humanos acometidos por esta forma da doença não dependem de insulina para controlar a doença (21). Este controle é obtido por meio de dieta apropriada, agentes hipoglicemiantes de uso oral e exercícios (22). A terapia com insulina pode tornar-se necessária frente a severa resistência à insulina e disfunção das células β. Alguns cães e gatos obesos são identificados com resistência à insulina associada à reduzida secreção do hormônio (14).

Praticamente todos os cães apresentam DMID no momento do diagnóstico, ou seja; sem administração de insulina não se obtêm controle dos sinais clínicos deixando o paciente em risco de desenvolver cataratas e cetoacidose diabética (23). 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 (14). O uso de dietas apropriadas e agentes hipoglicemiantes orais não é suficiente para manutenção do estado euglicêmico, o que gera dependência de insulina (13,22).

Diversos fatores estão envolvidos na etiopatogênese do DM em cães, dentre eles, a predisposição genética tem sido sugerida por associações familiares e análises de pedigree (15). Outros fatores potencialmente envolvidos são a insulite imunomediada, pancreatite, obesidade, antagonismos hormonais (hiperadrenocorticismo, diestro, acromegalia), fármacos (glicocorticóides, estreptozotocina), infecções, doenças intercorrentes (insuficiência renal, doença cardíaca), hiperlipidemia e amiloidose nas ilhotas; sendo este último não totalmente aceito (1).

A descoberta de que cerca de 50% dos cães diabéticos apresentam anticorpos contra células β suporta a existência de uma auto-imunidade humoral (3). Apesar de muitos cães desenvolverem diabetes secundária a ocorrência de pancreatite e antagonismos hormonais (diestro, acromegalia, hipercortisolismo), é possível identificar auto-anticorpos contra a isoforma 65 kDa da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65), e contra o antígeno-2 do insulinoma (IA-2) no soro de cães diabéticos. Estes antígenos de células β pancreáticas são comumente alvo do sistema imune em humanos com DM tipo I ou com a forma LADA. Contudo, ainda precisa ser estabelecido, se a presença destes anticorpos indica um processo patogênico imunomediado primário ou

simplesmente refletem uma resposta imune contra antígenos liberados como conseqüência da destruição de células β por algum outro processo patológico (18).

Alguns autores classificam o DM canino como diabetes insulino-deficiente (IDD) e diabetes insulino–resistente (IRD) (4). A IDD primária em cães seria caracterizada por uma perda progressiva de células β pancreáticas; causada por doenças como hipoplasia/abiotrofia congênita de células β, perda de células β secundária a doença pancreática exócrina, destruição imunomediada de células β ou idiopática (4).

A IRD primária resultaria de antagonismos à função da insulina por outros hormônios (progesterona, hormônio do crescimento, cortisol); iatrogênia (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. Nestes casos, o reconhecimento precoce da resistência à insulina e conseqüente tratamento da endocrinopatia concomitante, pode resolver o DM retornando a um estado euglicêmico sem o uso contínuo de insulina (22). Apesar de haver adequada massa de células β funcionais, estas não conseguem secretar insulina suficiente para a manutenção da euglicemia na presença de um antagonismo patológico aos efeitos da insulina (22). Falhas em corrigir rapidamente estes antagonismos resultam em perda de células β e eventual desenvolvimento de DMID secundário (1).

A maioria dos cães com diagnóstico recente de DM apresentam concentrações de insulina menores que 12 μU/mL (valores de referência para cães entre 5 – 25 μU/mL) ou muitas vezes concentrações indetectáveis. Concentrações maiores que 18 μU/mL sugerem a existência de células β 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 se recomendada

terapia insulínica nestas situações para correção da hiperglicemia e redução do estresse às células beta (glicotoxicidade) enquanto o antagonismo não é resolvido (1).

Diabetes Mellitus Gestacional

O DM em fêmeas intactas é freqüentemente associado a fase do ciclo estral onde predomina a progesterona (diestro), e assemelha-se ao diabetes gestacional (DMG) em humanos (4). O DMG em humanos é caracterizado como uma intolerância a carboidratos identificada pela primeira vez durante a gestação (24). A prevalência de DMG em humanos pode variar de 1 a 14% conforme a população estudada (25) 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 (26). A ocorrência de DMG transitório em uma mulher aumenta em até 62% a chance de desenvolvimento de DM tipo II posteriormente durante a vida da paciente (25). Além disto, o DMG em humanos, assim como em cães, frequentemente se associa a macrossomia fetal, óbito materno e/ou fetal, sofrimento fetal, distocia e hipoglicemia neonatal (27,28). As semelhanças bioquímicas na dinâmica de resistência a insulina em cadelas prenhes levaram a proposição do uso de cães como modelo de pesquisa para estudo das alterações metabólicas durante a gestação de mulheres (29)

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 sofrem diabetes reversível durante o diestro e que não são castradas apresentam grandes chances de tornarem-se diabéticas na próxima fase lútea do ciclo, independente da presença ou não de gestação (1 30).

Um estudo recente de uma série de casos de diabetes gestacional em cadelas (28) evidenciou que o diagnostico de diabetes normalmente é feito entre 30 e 64 dias após

o cruzamento, afetando normalmente cadelas de meia-idade (entre 2 e 8 anos), com uma tendência a maior predisposição ao desenvolvimento desta alteração em raças nórdicas Spitz, sugerindo uma predisposição genética ao desenvolvimento de DMG nestas raças. A maioria dos casos de DMG em cadelas, são causados por resistência à insulina pelos hormônios gestacionais (prolactina e progesterona) e desta forma tendem a ser reversíveis. Contudo a hiperglicemia crônica pode levar a um estado diabético irreversível em decorrência da glicotoxicidade sobre as células β, mesmo após o término da prenhes, especialmente se houverem outros fatores de risco envolvidos como autoimunidade e pancreatite. Da mesma forma, quanto mais velho o animal, teoricamente maior a chance de desenvolver DM permanente em decorrência da redução na capacidade de secreção de insulina associada ao envelhecimento (1,28).

Este mesmo estudo (28) evidenciou melhor prognóstico naqueles pacientes que foram tratados com o término farmacológico da gestação ou por ovário-histerectomia. A redução na concentração dos hormônios gestacionais pós término da prenhes pode levar a remissão do diabetes em menos de 10 dias, e o uso de insulina nestes pacientes esteve associado a melhores chances de remissão da doença, uma vez que estas pacientes estiveram mais protegidas do fenômeno da glicotoxicidade (28).

Em fêmeas caninas, a incidência de DM é duas vezes maior que em machos (3) e cerca de 70% pacientes diagnosticados com diabetes são fêmeas (3). Um estudo americano com 65 cadelas diabéticas evidenciou que 8% delas encontravam-se em diestro quando desenvolveram diabetes (1). Um estudo realizado na região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil encontrou uma incidência de 95% de fêmeas diabéticas em uma série de 20 pacientes diagnosticados com DM no período entre 2000 e 2004 (17). O mesmo estudo evidenciou que cerca de 69% destas pacientes desenvolveram DM durante o diestro. A vasta diferença entre o percentual de fêmeas

que desenvolveram diabetes durante o diestro pode ser conseqüência da prática de esterilização das fêmeas ser muito mais freqüente nos EUA do que no Brasil. 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 resposta a esta redução, a incidência de DMC em machos e fêmeas é similar (4). O principal fator envolvido no desenvolvimento do DMG seria a flutuação hormonal durante a gestação (31).

Autores estudaram o efeito dos hormônios gestacionais sobre a sensibilidade à insulina e observaram, em adipócitos de ratos em cultura, que durante a incubação com progesterona não foi afetada a ligação da insulina ao seu receptor (IR); porém, o transporte de glicose foi reduzido (12). A progesterona, associada ao cortisol, reduziu a ligação máxima da insulina ao receptor bem como o transporte de glicose para os tecidos. A prolactina e o lactogênio placentário humano também reduziram o transporte de glicose, porém não alteraram a ligação da insulina ao seu receptor. Todas estas evidências são consistentes com defeitos de sinalização da insulina em adipócitos durante a gestação (12). No entanto, a ocorrência de DMG humana, e o desenvolvimento posterior de DM tipo I ou tipo II após a gestação, está associado a uma série de fatores de risco genéticos, autoimunes, nutricionais e ambientais (25,26,32,33).

Na literatura, observa-se uma ampla variação no índice de recorrência de DMG em mulheres, bem como, na incidência e severidade da doença conforme a etnia (26,34). Autores demonstraram a presença de auto-anticorpos contra GAD (descarboxilase do ácido glutâmico), células das ilhotas (ICA – islet cell antibody) e contra a enzima tirosina fosfatase (IA-2A) em 24 de 385 mulheres com DMG (25). 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 β 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 (25). De acordo com o estado da arte sobre o DMC, a mesma lógica poderia ser aplicada ao DM com início durante o diestro. Evidências apontam para a presença de auto-anticorpos contra células β em cerca de 50% dos pacientes caninos com diagnóstico recente de DM (14). Entretanto, de cada 100 cães que recebem diagnóstico de DM, cerca de 70% são fêmeas (4), e destas aproximadamente 70% encontram-se no diestro no começo da doença (17). Não seria nenhuma surpresa a detecção de auto-anticorpos, evidenciando 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. Na espécie canina, a progesterona, assim como progestágenos sintéticos, pode aumentar a liberação do hormônio do crescimento (GH) pelo tecido mamário. Este GH mamário, além de efeitos autócrinos e parácrinos sobre a glândula mamária (proliferação e diferenciação da glândula durante o diestro e predisposição à tumores de mama), também apresenta um papel endócrino sobre as transformações hiperplásicas do endométrio (hiperplasia endometrial cística), além de poder levar a acromegalia e causar resistência à insulina (35,36). Considera-se que estes dois hormônios (progesterona e GH) são os principais indutores de resistência à insulina durante o diestro, e estão presentes em concentrações similares em fêmeas prenhes ou

não-prenhes em diestro. No entanto, fêmeas prenhes são mais insulino-resistentes do que fêmeas em diestro (10,37).

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 da prenhes praticamente idênticos (3), apesar de que na gestação hormônios placentários (estrógenos, lactogênio placentário e citocinas placentárias) também estão presentes (10,37), justificando a maior resistência à insulina durante a gestação. Cadelas com DM transitório, causado por diestro, apresentam grandes chances de desenvolver DMID na próxima fase lútea do ciclo estral. Por este motivo é recomendada a sua castração logo após o diagnóstico de DMC (3). Se o DM persistir após o fim do diestro, deve-se re-classificar como DMID (30).

O aumento na concentração sérica de progesterona durante o diestro pode causar diabetes em cadelas, por promover um efeito antagônico à insulina, reduzindo a ligação de insulina ao receptor e o transporte de glicose nos tecidos alvos (30,12) e, secundariamente, por promover a liberação de GH pela glândula mamária (36,38). Autores evidenciaram a ausência na supressão do GH frente à hiperglicemia em fêmeas em diestro ou tratadas com medroxiprogesterona (39). O GH, um dos hormônios contra-reguladores da insulina, reduz a concentração de receptores à insulina, reduzindo a captação de glicose nas células alvo (40). Contudo, outros autores consideram a redução na concentração dos IR na membrana celular das células

alvo, como uma conseqüência da *downregulation*[a] decorrente da hiperinsulinemia devido à resistência insulínica gerada pelo GH (41).

Os efeitos lipolíticos do GH também são antagônicos aos efeitos da insulina (42). Evidências acumuladas sugerem que o GH modula a sensibilidade à insulina por múltiplos mecanismos, pois as vias de sinalização intracelular do GH e de seu principal efetor, o IGF-I, convergem com as vias de sinalização intracelular da insulina (41). 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 em resíduos de serina, o que leva a não amplificação do sinal da insulina (41).

A modulação da expressão de algumas adipocitocinas como a adiponectina e visfatina também podem exercer um papel na resistência insulínica promovida pelo GH (41). Foram demonstradas alterações no padrão de secreção pulsátil de GH durante o diestro, com maiores concentrações séricas com menos pulsos (45). 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 (39,45).

---

[a] A *downregulation* é um fenômeno sem uma adequada tradução para o português, onde observa-se a redução na concentração de receptores para determinado hormônio frente a uma concentração excessiva de tal hormônio na circulação. O contrário, *upregulation*, também pode ocorrer.

Diversos autores afirmam 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 (39), mas também de fatores genéticos, auto-imunes ou ambientais associados (1,4,17,30) da mesma forma que no DMG humano.

Influência do Ciclo Estral sobre a Sensibilidade à Insulina

Apesar de ser notório o impacto dos progestágenos naturais ou sintéticos sobre a sensibilidade à insulina, pouca importância é dada ao efeito do estrogênio neste aspecto. O principal marcador hormonal da fase estrogênica 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 (5,6,7).

Em humanos algumas situações de resistência à insulina estão associadas a elevados valores de estrógenos (final da gestação, síndrome dos ovários policísticos), e estudos em ratos deixam claro o papel inibitório dos estrógenos sobre os transportadores de glicose dependentes de insulina; os GLUT-4 (43,44). Nestes modelos animais, observa-se que a castração aumenta a expressão de GLUT-4 no músculo e que a administração de estrógenos reduz novamente a expressão destes transportadores. Frente a maior expressão de GLUT-4 após castração, os adipócitos tornam-se hipertróficos e às vezes diferenciados (44).

Esta observação está de acordo com a observação natural de ganho de peso de fêmeas após a castração, comumente atribuída a maior atividade da enzima lipase lipoprotéica (enzima inibida por estrógenos e que atua estimulando a captação de ácidos graxos do sangue) (46). O efeito inibidor dos estrógenos sobre o GLUT-4 ainda não tem o

mecanismo elucidado completamente, supondo-se que possam ser efeitos diretos ou indiretos dos estrógenos. No entanto, está determinado em ratos, que os efeitos dos estrogênios são basicamente dependentes do tipo de receptor estrogênico (ER) ativado, sendo que estimulação sobre os ER-alfa ativa a expressão do GLUT-4 ao passo que a estimulação dos ER-beta suprime a expressão. Além disso, observou-se que durante a fase estrogênica do ciclo estral ocorre uma maior expressão dos receptores de estrogênio do tipo beta (44).

Estas considerações estão de acordo com a observação clínica de início rápido de descontrole do DM em fêmeas caninas sob terapia insulínica já no início do pró-estro, momento em que as concentrações de estrógenos começam a elevar-se no plasma (1). Alterações na sensibilidade à insulina podem se manifestar por meio de alterações nos indicadores de lipemia dos pacientes (17). Contudo não são observadas diferenças significativas nos valores de triglicerídeos e de colesterol em cadelas em anestro, estro ou diestro (47,48). Pacientes naturalmente diabéticas não castradas, durante as fases estrogênica e lútea do ciclo estral, apresentam concentrações maiores de lipídeos quando comparadas àquelas 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 (47).

Segundo alguns autores (30), o clássico trabalho que associa a obesidade à intolerância à glicose em cães (49) não pode descartar a ocorrência conjunta de antagonismo promovido pela progesterona, uma vez que de 15 cadelas avaliadas, 13 não eram castradas. A fructosamina, formada através de uma reação de conjugação não enzimática e irreversível de uma molécula de glicose de cadeia aberta a resíduos de aminoácidos de proteínas plasmáticas (especialmente a albumina), é uma das

principais ferramentas no diagnóstico e controle em longo prazo da glicemia de pacientes diabéticos (16,22,50,51).

A concentração de fructosamina oferece um indicador da glicemia nas últimas duas semanas, uma vez que a meia vida da albumina, principal proteína plasmática é de cerca de 8 dias (52). A mensuração sérica de fructosamina em cadelas em anestro, estro ou diestro não evidenciou diferenças significativas que pudessem indicar ou suportar alterações no estado glicêmico dos animais que participaram de estudos anteriores (47). Frente as diferentes fases do ciclo estral, não foi possível identificar perfis diferentes na resposta da glicemia e da insulinemia frente a um teste de tolerância à glicose intravenosa (IVGTT), tão pouco na glicemia ou insulinemia em jejum (53). A aplicação do índice HOMA (*homeostatic model assessment*) de percentual de atividade das células β (HOMA B) e de resistência à insulina (HOMA R) foi aplicado na mesma população estudada (53) não evidenciando alterações significativas entre os grupos anestro, estro e diestro (47, 53).

O índice insulinogênico (II) (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) (55), e a relação glicose / insulina corrigida (RG/IC) (1,56), aplicados a mesma população, evidenciaram valores médios do grupo diestro na faixa de hiperinsulinemia relativa / resistência à insulina (II > 0,250; RG/IC > 30) (47,53). 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 (57,58). O uso de testes mais simples, como o índice HOMA, tem sido validado para uso clínico em humanos diante do padrão ouro para avaliação da sensibilidade à insulina (*clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico) (58). A aplicação destes índices de

sensibilidade à insulina em ensaios clínicos veterinários ainda é bastante restrita (53,56)

A técnica do clamp apresenta a capacidade de avaliar tanto a resistência periférica como a hepática aos efeitos da insulina, assim como o IVGTT (58,59). 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 (47). Estes achados estão em concordância com autores que evidenciaram resistência à insulina especialmente no tecido muscular frente à administração seqüencial de estrógenos e progestágenos, de forma a mimetizar a ocorrência do ciclo estral (60).

A falta de valores de referência para estes parâmetros em cães, bem como pontos de corte em testes provocativos prejudicam a avaliação destes parâmetros nestes animais (53). O ΔIns/ΔGli (Delta insulina/glicose) aos 5 minutos de IVGTT é um índice de sensibilidade à insulina adaptado de testes diagnósticos de mulheres com DMG (61) e que aplicado a cadelas em diferentes fases do ciclo estral durante um IVGTT evidenciou que pacientes em estro e diestro apresentaram uma fraca resposta ao desafio com glicose (47), mesmo padrão de resposta observado em humanos com DMG.

Pesquisas clínicas em humanos evidenciaram que eventualmente estas fracas respostas estão associadas ao desenvolvimento de diabetes no futuro após término da gestação (61). Alguns autores evidenciaram a presença de risco de morbidades associadas ao DMG mesmo em mulheres gestantes com somente um valor alterado durante um OGTT (teste de tolerância à glicose oral), mostrando que os efeitos metabólicos da

DMG podem estar presentes mesmo quando os testes falham em demonstrar este quadro (62).

De acordo com estes achados, alguns trabalhos evidenciaram um efeito inibitório da administração seqüencial dos hormônios estradiol e progesterona sobre a secreção de insulina (63), assim como, a ocorrência natural de estro e diestro levando a uma menor capacidade de resposta das células beta, tanto em fêmeas sadias, como em fêmeas diabéticas (64). Da mesma forma, demonstrou-se que a ovariectomia promoveu hipertrofia e proliferação de ilhotas de Langerhans, resultando em uma maior capacidade secretora de insulina pelas células beta nas cadelas gonadectomizadas (65). Contudo, somente a minoria das cadelas não castradas desenvolve diabetes, apesar da maioria das que desenvolvem estarem no diestro (4,17).

Uma vez que a síntese de glicogênio depende do estímulo insulínico (66), um estado de resistência à insulina poderia provocar menor captação de glicose e síntese de glicogênio nas pacientes. No entanto, a determinação da concentração de glicogênio muscular não mostrou diferenças no tecido muscular em resposta à insulina durante o ciclo estral em cadelas (47).

Não se conhece na literatura veterinária, o papel de alterações nas características dos receptores de insulina e dos passos pós-receptor da sinalização da insulina na etiopatogênese do diabetes mellitus canino (1). Demonstrou-se, através de experimentos de ligação com insulina marcada, à presença de dois sítios de ligação à insulina em tecido muscular, hepático e cardíaco de cães (67). Estas duas populações de receptores são constituídas de: 1) uma população de receptores de alta afinidade; porém, baixa capacidade de ligação e 2) uma população de receptores de baixa afinidade; porém, elevada capacidade de ligação (20,67). A avaliação da capacidade e afinidade da ligação da insulina ao IR foi avaliada no tecido muscular esquelético de

fêmeas caninas em diferentes fases do ciclo estral (47,53,68). Observa-se uma menor afinidade de ligação no estro (quatro vezes menor) e no diestro (três vezes menor) quando comparado ao anestro. Nestes estudos demonstrou-se que foi necessária, respectivamente, concentrações quatro e três vezes maior de insulina (através da análise dos valores de *Kd* – constante de dissociação) para que fossem ocupados metade dos receptores de insulina em fêmeas no estro e diestro (*i.e.* durante o estro há uma necessidade 4 vezes maior e durante o diestro uma necessidade 3 vezes maior de insulina para ocupar metade dos receptores teciduais) (68).

No entanto, nesta população estudada composta de cadelas jovens e saudáveis, observou-se que o tecido responde a esta menor afinidade de ligação, aumentando a capacidade de ligação total do tecido. Ambas alterações foram observadas somente nos receptores de alta afinidade/baixa capacidade (68). 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 (20).

Após a ligação da insulina ao IR, ocorre a autofosforilação das sub-unidades β do receptor em resíduos de tirosina (atividade tirosina quinase). A fosforilação destes resíduos estimula o recrutamento de moléculas intracelulares chamadas de IRSs (substratos ao receptor de insulina), os quais sofrem fosforilação e intermedeiam os primeiros passos intra-celulares na propagação do sinal insulínico (69). A capacidade basal de fosforilação destes receptores a partir de preparações de membranas plasmáticas musculares de cadelas em diferentes fases do ciclo estral foi avaliada (68) por meio da fosforilação do substrato sintético Poly (Glu;Tyr 4:1); o qual mimetiza o IRS-1 (70,71). A fosforilação do IRS-1 é considerada o primeiro passo intracelular da transdução do sinal insulínico (41,69,72). Também foi demonstrado que a atividade

tirosina quinase no tecido muscular de pacientes caninas em estro e diestro está reduzida quando comparadas às fêmeas em anestro (68). Outros autores observaram reduzida fosforilação dos receptores de insulina em músculo esquelético de mulheres obesas com DMG (73).

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 (47,64). 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 (1,17). Assim, pode-se concluir que a fase do diestro, *per se*, não seria a responsável pela indução do diabetes (63,64). Da mesma forma, diversas evidências apontam que a ocorrência do DMG humano também depende de uma série de fatores genéticos e ambientais (26,31,32,33). 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 alguns autores (39), e dependeria mais de diversos fatores, ambientais, auto-imunes, raciais e genéticos (1).

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 (68). 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 (1,64). Além do mais, uma possível falha em aumentar a capacidade de ligação do tecido muscular frente a menor afinidade de ligação foi

especulada como um fator extra, estimulando o início do diabetes em fêmeas durante o diestro (47,68).

Por estas razões, a ovario-histerectomia é considerada parte obrigatória do tratamento do diabetes mellitus em fêmeas (1). Além disso, pode-se preconizar também a ovário-histerectomia como um procedimento que pode reduzir as chances de uma fêmea tornar-se diabética no futuro. O manejo de uma fêmea diabética não castrada torna-se perigoso e desafiador a medida que inicia-se a atividade ovariana durante o estro, perdurando um claro antagonismo hormonal durante o diestro, o que coloca a paciente em risco de desenvolvimento de complicações do diabetes, como a catarata e a cetoacidose diabética (1,3,15,17). Além disso, os aumentos de dose de insulina necessários nestas situações podem acabar predispondo a complicações associadas a hipoglicemia, uma vez que o grau de resistência à insulina é variável à medida que o ciclo estral progride (1,68). Em suma, uma dose recém ajustada para combater uma resistência à insulina durante o estro, pode transformar-se em sobre-dose a medida que o ciclo estral vai progredindo em direção ao anestro (1,68). Desta forma a ovario-histerectomia deve ser realizada tão logo o paciente tenha sido estabilizado após o diagnóstico inicial e tenha condições para um procedimento cirúrgico (1).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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 humano. 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, alem do fato da capacidade secretora de insulina reduzir com a idade. 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 e a pancreatite crônica, dentre outros (1,4,14,15,19,17,30). 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.

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 no tecido muscular. Contudo, a resposta do sistema a esta menor afinidade e atividade tirosina quinase em cadelas saudáveis parece ser um aumento na capacidade de ligação hormônio-receptor no tecido muscular. Esta maior capacidade de ligação é capaz de manter a tolerância à glicose e evitar o surgimento de uma resistência insulínica severa. Uma eventual falha neste mecanismo compensatório poderia estar envolvida na ocorrência de diabetes em fêmeas caninas durante o diestro (68). Desta forma, reforça-se a importância da castração não só como um ponto fundamental no controle da fêmea diabética, como também um mecanismo de proteção contra a ocorrência da doença em cadelas.

ABSTRACT

Canine diabetes mellitus is one of the most commom endocrine diseases in veterinary practice. Female dogs are more prone to diabetes development, and the incidence is greater during diestrus, making clear that diabetes mellitus in female dogs are quite similar to gestational diagetes mellitus in humans. The classical explanation for female dogs suscetibility to diabetes involve the effects of progesterone and progesterone induced GH secretion by mammary gland during diestrus. However, many evidences have been shown that other issues are associated to insulin resistance during diestrus, and that molecular, nutritional, genetics and autoimmune factors are also implicated.

Key words*: insulin resistance, estrus cycle, bitches, gestational diabetes.*

REFERÊNCIAS

1. Feldman EC, Nelson RW. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3.ed. Missouri:Saunders, 2004. 1089p.

2. Plummer CE, Specht A, Gellat KN. Ocular manifestations of endocrine disease. Compendium. Dezember 2007: 734-743.

3. Fleeman LM, Rand JS. Managament of canine diabetes. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. v.31, n.5, p.855-879, 2001.
4. Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach - us new tricks? Diabetologia. v.48:1948-1956; 2005.
5. Hoffmann B, Riesenbeck A, Klein R. Reproductive endocrinology of bitches. Animal Reproduction Science. v.42:275-288; 1996.

6. Oliveira ERS, Marques Junior AP, Neves MM. Endocrinologia reprodutiva da fertilidade da cadela – revisão. Archives of Veterinary Science. v.8(1):1-12; 2003.
7. Rodrigues BA, Rodrigues JL. Endocrinologia reprodutiva na cadela. Clínica Veterinária. v.40:50-58; 2002.
8. Thompson FN. Reprodução em mamíferos do sexo feminino. In: Reece WO. Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 644-669; 2006.
9. Johnson CA. High-risk pregnancy and hypoluteodism in the bitch. Theriogenology.v. 70: 1424-1430, 2008.
10. Kustritz MVR. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. Theriogenology. V. 64:755-765, 2005.
11. Martins LR, Lopes M D. Pseudociese canina. Rev Bras Reprod Anim v.29, n.3/4, p.137-141, jul./dez. 2005.
12. Ryan EA, Enns L. Role of gestacional hormones in the induction of insulin resistance. Journal of Clinical Endocrionology and Metabolism. 67:341, 1988.
13. Schulman RL. Insulin and others therapies for diabetes mellitus. Veterinary Medicine. p.334-347, april, 2003.
14. Hoenig M. Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. Molecular and Cellular Endocrinology. v.197, p.221-229, 2002.
15. 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.
16. Greco DS. Diagnosis of diabetes mellitus in dogs. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.v.31, n.5, p.844-853, 2001.

17. Pöppl AG, González FHD. Aspectos epidemiológicos e clínico - laboratoriais da diabetes mellitus em cães. Acta. Scien. Veterin. 33(1): 33 - 40, 2005.
18. Davison LJ, Weenik SM, Christie MR, Herrtage ME, Catchpole B. Autoantibodies to GAD65 and IA-2 in canine diabetes mellitus. Veterinary Immunology and Immunopathology. V. 126: 83-90, 2008.Mcgarry JD. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of tipe 2 diabetes. Diabetes. v.51, p.7-18, 2002.
19. Mcgarry JD. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of tipe 2 diabetes. Diabetes. v.51, p.7-18, 2002.
20. Griffin JE, Ojeda SR. Textbook of Endocrine Physiology. 5th ed. New York: Oxford University Press, 2004. 431 p.
21. Nelson RW. Disorders of the endocrine pancreas. In: Nelson RW and Couto CG (eds.) Small Animal Internal Medicine. 3.ed. StLouis: Mosby, 2003. p.729-778.
22. Behrend EN. Diabetes mellitus: an update on oral hypoglycemic agents and monitoring options. Veterinary Medicine. October, p.743-751, 2002.
23. Nelson RW. Diabete melito. In: Ettinger SJ., Feldman EC (eds.) Tratado de Medicina Interna Veterinária. 4.ed. SãoPaulo: Manole,1997. v.2. p.2085-2122.
24. Russell MA, Carpenter MW, Coustan DR. Screening and diagnosis of gestacional diabetes mellitus. Clinical Obstetrics and Gynecology. v.50(4):949-958; 2007.
25. 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.

26. Kim C, Berger DK, Chamany S. Recurrence of gestacional diabetes mellitus. Diabetes Care.v.30 (5): 1314 - 1319; 2007.

27. Philips, PJ. Gestational diabetes: Worth finding and actively treating. Australian Family Physician. V. 35, n.9, p. 701-703, 2006(2006 ou 2007?).

28. Fall T, Kreuger SJ, Juberget A, Bergström A, Hedhammar A. Gestational diabetes mellitus in 13 dogs. Journal veterinary Internal Medicine. v. 22:1296-1300, 2008.

29. Connolly CC, Aglione LN, Smith MS, Lacy DB, Moore MC. Insulin action during late pregnancy in the conscious dog. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism. V. 286: E909-E915, 2004.

30. Rand JS, Fleeman LM, Farrow HA, Appleton DJ, Lederer R. Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture? The Journal of Nutrition. v. 134: 2072S - 2080S; 2004.

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

32. Chu SY, Callagan WM, KIim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ *et al*. Maternal obesity and risk of gestacional diabetes mellitus. Diabetes Care.v.30 (8): 2070 - 2076; 2007.

33. Watanake RM, Black MH, Xiang AH, Allayee H, Lawrence JM, Buchanan TA. Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. Diabetes Care. v.30 (2 suppl): S134-S140; 2007.

34. Beischer NA, Oats JN, Henry AO, Sheedy MT, Walstab JE. Incidence and severiry of gestacional diabetes mellitus according to country of birth in woman living in Australia. Diabetes. v. 40, (2 suppl): 35-38; 1991.

35. Ferreira CR, Lopes MD. Complexo hiperplasia cística endometrial/piometra em cadelas–revisão. Clínica Veterinária. n.27, p.36-44, 2000.
36. Rijnberk A, Kooistra HS, Mol JA. Endocrine diseases in dogs and cats: similarities and differences with endocrine diseases in humans. Growth Hormone and IGF Reasearh. v.13, p.S158-S164, 2003.
37. Johnson CA. Glucose homeostasis during canine pregnancy: insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. Theriogenology 70 (2008) 1418-1423.
38. Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, 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.
39. Eingenmann JE, Eingenmann RY, Rijnberk A, Gaag I, Zapf J, Froesch ER. Progesterona-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. Acta Endocrinológica. v.104:167-176; 1983.
40. Moller D, Flier JS. Insulin resistance. Mechanisms, syndromes, and implications. New England Journal of Medicine. 3325:938, 1991.
41. Dominici FP, Argentino DP, Muñoz MC, Miquet JG, Sotelo AI, Turyn D. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signaling on the modulation of insulin sensitivity. Growth Hormone & IGF Research. v. 15: 324-336; 2005.
42. Ganong WF. Review of Medical Physiology. 22 ed. Connecticut: Lange, 2005. 912p.
43. Godsland IF. Oestrogens and insulin secretion. Diabetologia 48: 2213-2220, 2005.

44. Barros RPA, Machado UF, Warmer M, Gostafsson JÁ. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERβ and ERα. PNAS. v.31: 1605-1608, 2006.
45. Kooistra HS, den Hertog E, Okkens AC, Mol JÁ, 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.
46. Fingland RB. Ovário-histerectomia. In: Bojrab MJ (Ed.). Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais. São Paulo: Roca, p. 375-380, 1996.
47. Renauld A, Gomez NV, Scaramal JD, Garrido D, Wanke MM. 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.
48. Pöppl AG. 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 [Dissertação de Mestrado], Porto Alegre, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
49. Mattheeuws D, Rottiers MD, Kaneko JJ, Vermeulen MD. Diabetes mellitus in dogs: relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response. American Journal of Veterinary Research. v. 45: 98-103; 1984.
50. Jensen AL. Gycated blood proteins in canine diabetes mellitus. Veterinary Record. v. 137:401-405; 1995.
51. Loste A, Marca MC. Fructosamine and glycated hemoglobin in the assesment of glycaemic control in dogs. Veterinary Research. V.32:55-62, 2001.
52. Kaneko JJ, Harvey JW, Russ MC. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5. ed. Missouri: Academic Press,1997. 932 p.

53. Pöppl AG, Mottin TS, Dias CB, Breitsmater I, Beck CAC, Lasta C *et al*. Estudo preliminar da ligação hormônio-receptor da insulina em membranas de músculo e da tolerância à glicose em fêmeas caninas durante o ciclo estral. Acta Scientiae Veterinariae v. 35: 462-464, 2007.

54. Pöppl AG, Lasta CS, González FHD, Kucharski LC, Da Silva RSM. Índices de sensibilidade à insulina em fêmeas caninas: efeito do ciclo estral e da piometra. Acta Scientiae Veterinariae. v. 37(4):341-350, 2009.

55. Gutt M, Davis CL, Spitzer SB, Llabre MM, Kumar M, Czarnecki EM *et al*. Validation of the insulin sensitivity index (ISI0,120): comparison with other measures. Diabetes Research and Clinical Practice. v. 47: 177–184; 2000.

56. Kogika MM, Brandão LP, Jericó MM, Hagiwara MK, Simões DMN, Mendonça B. Determinação das concentrações séricas de glicose e insulina de cães em choque endotóxico. Ciência Rural. v. 31 (5): 813-817; 2001.

57. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA. Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β-cell function from fasting glucose and insulina concentrations in man. Diabetologia. v. 28: 412-419; 1985.

58. Oliveira EP, Souza MLA, Lima MDA. Índice HOMA (homeostasis model assessment) na prática clínica: uma revisão. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. v. 41 (4): 237-243; 2005.

59. Kirwan JP, Huston-Presley L, Kalhan SC, Catalano PM. Clinically useful estimates of insulin sensitivity during pregnancy: validation studies in women with normal glucose tolerance and gestacional diabetes mellitus. Diabates Care. v. 24 (9): 1602-1607; 2001.

60. Batista MR, Smith MS, Snead WL, Connolly CC, Lacy DB, Moore MC. Chronic estradiol and progesterone treatment in conscious dogs: effects on insulin sensitivity and response to hypoglicemia. American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology. v. 289: R1064-R1073; 2005.

61. Omori Y, Minei S, Uchigata Y, Shimizu M, Sanaka M, Honda M *et al*. Comparison of diagnostic criteria of GT, borderline e GDM: blood glucose curve and IRI response. Diabetes. v. 40 (2); 30-34; 1991.

62. Cianni GD, Seghieri G, Lencioni C, Cuccuru I, Anichini R, Bellis AD *et al*. Normal glucose tolerance and gestacional diabetes mellitus. What is in between? Diabetes Care. v. 30 (7): 1783-1788; 2007.

63. Renauld A, Sverdlik RC, Agüero A, Pérez RL. Influence of estrogen-progesterone sequential administration on pancreas cytology. Serum insulin anda metabolic adjustments in female dogs. Acta Diabetológica Latina. v. 27: 315-327; 1990.

64. Scaramal JD, Renauld A, Gomez NV, Garrido D, Wanke MM, Marquez AG. Natural estrous cycle in normal and diabetic bitches in relation to glucose and insulin tests. Medicina (Buenos Aires). v. 57: 169-180; 1997.

65. Renauld A, Sverdlik RC, Lawzewitsch IV, Agüero A, Pérez RL Rodríguez RR *et al*. Metabolic and hitologycal pancreatic changes induced by ovariectomy in the female dog. Acta Physiologica Pharmacologica Latino americana. v. 37:289-304; 1987.

66. Newsholme EA, 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.

67. Johnston V, Frazzini V, Davidheiser S, Przybylski RJ, Kliegman RM. Insulin receptor number and binding affinity in newborn dogs. Pediatric Research. v. 29 (6): 611-614; 1991.

68. Pöppl AG, Valle SC Beck CAC, Kucharski LC, Da Silva RSM. Effect of estrus cycle and pyometra on insulin receptor tirosine kinase activity and insulin receptor binding in female dogs. Clínica Veterinária. Ano XIV, (Suppl): 136-138, 2009.

69. Pirola L, Johnston AN, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. Diabetologia. v.47, p. 170-184, 2004

70. Kucharski LCR, Capp E, Chittó ALF, Trapp M, Silva, RSM, Marques M. Insulin signaling: tyrosine kinase activity in the crab Chasmagnathus granulata gills. Journal of Experimental Zoology. 283: 91-94, 1999.

71. Orcy RB, Brum I, Silva RSM, Kucharski LCR, Corleta HVE, 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): 107-10; 2005.

72. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. v. 414, p. 799-806, 2001.

73. Shao J, Catalano PM, Yamashita H, Ruyter I, Smith S, Youngren J *et al*. Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese woman with gestational diabetes mellitus (GDM). Evidence for increased serine/threonine phosphorylation in pregnancy and GDM. Diabetes 2000;49:603-610.

4.2. Artigo 2

Diabetes mellitus remission after resolution of inflammatory and progesterone-related conditions in bitches

A.G. Pöppl[a,*], T.S. Mottin[b], F.H.D. González[c]

[a] *Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, Brazil.*

[b]*Hospital de Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, Brazil.*

[c]*Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, Brazil.*

* Corresponding author: Tel: +55 51 33088033; Fax: +55 51 33086112.

E-mail: gomespoppl@hotmail.com (A.G. Pöppl)

ABSTRACT

Canine diabetes mellitus (CDM) remission is a rare event that is possible after the resolution of insulin resistance conditions, especially those related to the estrus cycle. A retrospective study was carried out at the Division of Veterinary Endocrinology from 2006 to 2011 to assess CDM remission rates after the resolution of problems associated with ovarian activity. Out of 117 female dogs diagnosed with CDM, six diabetes remission cases were identified and described after resolution of diestrus (1), or after ovariohysterectomy for pregnancy (1), ovarian remnant syndrome (1), and pyometra (3), even after initial presentation in severe diabetic ketosis or long after diagnosis (ovariohysterectomy was performed from 3 to 81 days after diagnosis, and diabetes resolution was achieved within 4 to 39 days after gonadectomy). Several factors may lead to diabetes remission. However, in these cases, ovariohysterectomy was crucial for the restoration of normal blood glucose levels, suggesting that diabetic bitches be spayed independently of the length of time after diagnosis.

Keywords: insulin resistance; diestrus; gestational diabetes; pyometra

One of the subtypes of canine diabetes mellitus (CDM) in bitches can be compared to gestational diabetes mellitus (GDM) in humans, characterizing a subtype of insulin-resistant diabetes mellitus (IRD) (Catchpole et al., 2004; Fall et al., 2007). Since the 1950s, development of diabetes shortly after estrus has been well recognized in bitches and ovariohysterectomy (OHE) has been recommended as radical treatment of CDM (Campbell, 1958; Wilkinson, 1960). In the 1960s, Krook *et al.* (1960) first correlated CDM with pyometra, another typical condition associated with diestrus (Noakes et al., 2001) characterized by purulent fluid collection within the uterus with variable amounts of inflammatory cells in the uterine wall, that may or may not be

preceded by cystic endometrial hyperplasia (Feldman and Nelson, 2004). Although insulin resistance mediated by progesterone is well characterized (Scaramal et al., 1997; Connolly et al., 2004; Batista et al., 2005), there is a paucity of case reports correlating CDM with diestrus, and mainly on its remission after spaying (Fall et al., 2008; Fall et al., 2010).

Moreover, although Fall *et al*. (2010) described a diagnostic prevalence of 17% for pyometra in females with concomitant CDM during diestrus, to our knowledge, there is no case report on the remission of diabetes after the resolution of the cystic endometrial hyperplasia-pyometra (CEH-P) complex, a condition associated with more severe insulin resistance due to the hormonal profile during diestrus and also to the septic/inflammatory process (Pöppl et al., 2009). The aim of this study was to investigate CDM remission after the resolution of clinical conditions associated with ovarian luteal activity.

A retrospective study was carried out by analyzing medical records of patients treated at the Division of Veterinary Endocrinology between 2006 and 2011, searching for female dogs diagnosed with remission of CDM after resolution of clinical situations related to ovarian luteal activity. The criteria used to confirm the diagnosis of CDM were clinical signs, especially polyuria and polydipsia, as well as persistent glucosuria and hyperglycemia (> 200 mg/dL). The criteria used to define the remission of CDM were maintenance of normal blood glucose levels after discontinuation of insulin therapy, often defined after recurrent hypoglycemia, even after successive reductions in insulin dose. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of our University (CEUA/18.336).

Out of 117 female dogs diagnosed with CDM (patients with concomitant hyperadrenocorticism or hypothyroidism were not included), 72 (62%) had not been

spayed at diagnosis, and from those, 35 (30%) were diagnosed during the diestrus phase of the estrus cycle. From those 72 intact bitches, 57 (79%) were spayed after CDM diagnosis. Six patients, with mean age of 8.5 years (range of 6-12 years), met the criteria for remission of CDM, after variable periods on insulin therapy. Only one patient had spontaneous remission of the disease at the end of diestrus (11 days after diagnosis and onset of insulin therapy), whereas the remaining five patients (9%) showed remission, on average 13.6 days (range of 4-39 days) after ovariectomy or OHE. Table 1 shows some clinical and laboratory details of each case.

Progesterone-related clinical conditions whose resolution was associated with the remission of CDM in these patients were: diestrus, gestation, ovarian remnant syndrome (n=1 each) and CEH-P (n=3). Surprisingly, four of these patients were initially diagnosed with severe diabetic ketosis due to severe apathy, anorexia, vomiting, Kussmaul breathing, severe hyperglycemia (> 500 mg/dL) and severe ketonuria (> 80mg/dL). One patient with initial presentation in ketosis, had already been spayed, but often showed signs of heat. The abdominal ultrasound evaluation suggested the presence of ovarian remnant tissue, with quick remission of diabetes within 4 days after ovariectomy. CEH-P was observed and confirmed by histopathology in two patients after uterine examination in the postoperative period, and CEH-P was strongly suggested in another patient by abdominal ultrasound before surgery. As to the pregnant patient, the owner's decision to terminate pregnancy was only made after failure to control blood glucose levels 4 days after stabilization of diabetic ketosis detected at initial diagnosis. The patient with spontaneous remission of diabetes at the end of diestrus had a relapse when the animal came into heat again 4 months after remission, but this time the condition was permanent.

While dogs diagnosed with CDM are totally dependent upon insulin therapy for control of their clinical signs (Catchpole et al., 2004; Feldman and Nelson, 2004), case reports on remission of diabetes after control of situations which cause insulin resistance reveal that, in some cases, beta cells are not yet completely impaired at diagnosis and, therefore, they can maintain normal glucose levels, provided that the cause of insulin resistance is identified and eliminated. It has been demonstrated by Imamura et al. (1988) that chronic exposure to hyperglycemia may induce severe insulin-dependent diabetes in dogs (glucotoxicity).

Despite the fact that CDM is often associated with destruction of beta cells secondary to pancreatitis, or secondary to an autoimmune attack (Catchpole et al., 2004; Feldman and Nelson, 2004), whose inheritance (Catchpole et al., 2008) is to be unraveled, Fall *et al.* (2010), in a case series of diabetes secondary to diestrus or gestation in the Norwegian Elkhound breed, showed that none of the patients had GAD-65 autoantibodies, thus indicating a non-autoimmune etiology. Moreover, some environmental factors such as overweight, lack of physical activity and an unbalanced diet have been implicated as risk factors for the development of CDM (Klinkenberg et al., 2006) and overweight was described as a risk factor for diabetes secondary to diestrus in Elkhounds (Wejdmark et al., 2011). Likewise, in humans, GDM is also associated with advanced age, family history, ethnicity, and overweight (Phillips, 2006).

Nordic Spitz dogs are usually overrepresented in epidemiological studies on diabetes (Guptill et al., 2003; Fall et al., 2007; Fall et al., 2008), suggesting a probable genetic factor, whereas the Norwegian Elkhound breed was proposed as a model for the investigation of diabetes secondary to progesterone stimulation (Fall et al., 2010). However, this phenomenon seems to be frequent in several other breeds that are

apparently also prone to the development of diabetes, such as Poodle, Beagle and Teckel (Guptill et al., 2003; Fall et al., 2007).

The hormonal profile of diestrus is similar to that of gestation in bitches and is associated with a plasma progesterone increase from < 1 ng/mL during anestrus to plateau levels greater than 45 ng/mL during diestrus or gestation (Feldman and Nelson, 2004). At the end of gestation, the serum levels of prolactin (a diabetogenic hormone) are raised, causing more severe insulin resistance (Connolly et al., 2004). This greater insulin resistance associated with gestation may explain why the diabetes remission rate was greater in the study of Fall et al. (2008) with gestational diabetic bitches than in this study.

Ryan and Enns (1988) analyzed fat cell cultures and demonstrated that progesterone inhibits insulin binding to the insulin receptor (IR) and inhibits the tyrosine kinase activity of the receptor. We have recently shown that estrus cycle phases modulate and eventually reduce the tyrosine kinase activity in the musculoskeletal tissue of bitches (Pöppl et al., 2012). Selman et al. (1994) found that progesterone stimulates a rise in growth hormone (GH) secretion by the mammary gland in bitches, and in some cases, progesterone-induced GH hypersecretion may be conducive to acromegaly (Eigenmann et al., 1983). There is a lot of evidence indicating that GH modulates insulin sensitivity by means of several intracellular mechanisms due to the influence of the crosstalk between GH/insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and insulin signaling (Dominici et al., 2005). Therefore, bitches exposed to high progesterone concentrations can develop strong insulin resistance associated with a higher basal hepatic glucose release, skeletal muscle insulin resistance and overt diabetes (Scaramal et al., 1997; Connolly et al., 2004; Batista et al., 2005). This helps explain why bitches are more prone to CDM than males, and

why they are often in diestrus at the time of diagnosis (Guptill et al., 2003; Batista et al., 2005).

It should be remarked that an ovarian remnant can behave just like normal ovarian tissue (Feldman and Nelson, 2004) and it may trigger strong insulin resistance and lead to diabetes mellitus during diestrus, as shown in one case, with quick remission of diabetes after ovariectomy. Furthermore, female animals that have spontaneous remission of diabetes after the end of diestrus, if not spayed, are at a greater risk for permanent diabetes in their subsequent heat, as observed in the present case report. Women with transient GDM have the same increased diabetogenic potential in a subsequent pregnancy (Phillips, 2006). Coincidentally, the pregnant patient was the youngest one, corroborating the finding that gestational diabetes occurs at younger ages than diabetes secondary to diestrus (Fall et al., 2008).

While progesterone-induced GH secretion plays a major role in CDM development during diestrus, the magnitude of GH response to progesterone as well as tissue response to GH and the glycemic/insulinemic responses to this phenomenon is quite variable from dog to dog (Eigenmann et al., 1983; Selman et al., 1994), due to many unclear variables such as genetics, nutrition, and environment (Guptill et al., 2003; Klinkenberg et al., 2006; Wejdmark et al., 2011). In this scenario, the role played by inflammatory cytokines in inducing insulin resistance cannot be ruled out as in the case of CEH-P (Pöppl et al., 2009). The largest concentration of inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1, IL-6) under sepsis, or chronic inflammation conditions, inhibits the intracellular signaling of insulin through different mechanisms (Tilg and Moschen, 2008), explaining the severe insulin resistance observed in bitches with pyometra (Pöppl et al., 2009). Nonetheless, studies that correlate insulin sensitivity with septic/inflammatory processes in dogs are rare (Pöppl et al., 2009; Fall et al.,

2010) and ever since Krook *et al.* (1960) correlated diabetes with pyometra, no other study linking these diseases frequently seen in routine practice has been published. The remission of CDM after resolution of CEH-P strengthens this association. Moreover, remission of progesterone-related diabetes in dogs is expected to occur only if progesterone withdrawal occurs few weeks after CDM diagnosis (Eigenmann et al., 1983; Fall et al., 2008; Fall et al., 2010). The unexpected long interval (37, 46 and 81 days) between diabetes diagnosis and OHE in three bitches reinforces this possible role of insulin resistance due to CEH-P when compared with the other bitches that were neutered quickly after CDM diagnosis.

Although there is agreement that the chance of remission is higher when OHE is performed as soon as possible after the development of diabetes mellitus (Feldman and Nelson, 2004), we conclude that remission is possible even after some weeks between diagnosis and therapeutic OHE in some specific cases, even when severe ketosis is observed at presentation. It is assumed that maintenance of insulin therapy played a crucial role for protection against severe glucotoxicity in this case series. Different aspects led to the remission of CDM in these cases, but OHE played a key role, being therefore recommended for bitches with DM, not only as a way to prevent treatment complications, but also as a way to induce remission of the disease by allowing a new hormonal balance after the removal of the progesterone source, or elimination of inflammatory cytokines in case of pyometra.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq (Brazilian National Research Council).

References

Batista, M.R., Smith, M.S., Snead, W., Connolly, C.C., Lacy, D.B., Moore, M.C., 2005. Chronic estradiol and progesterone treatment in conscious dogs: effects on insulin sensitivity and response to hypoglicemia. American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 289, R1064-R1073.

Campbell, E.A., 1958. The treatment and control of diabetes in the dog. Australian Veterinary Journal 34, 222-225.

Catchpole, B., Ristic, J.M., Fleeman, L.M., da Vison, L.J., 2005. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? Diabetologia 48, 1948-1956.

Catchpole, B., Kennedy, L.J., Davison, L.J., Ollier, W.E.R., 2008. Canine diabetes mellitus: from phenotype to genotype. Journal of Small Animal Practice 49, 4-10.

Connolly, C.C., Aglione, L.N., Smith, M.S., Lacy, B., Moore, M.C., 2004. Insulin action during late pregnancy in the conscious dog. American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism 286, E909-E915.

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 and IGF Research 15, 324-336.

Eingenmann, J.E., Eingenmann, R.Y., Rijinberk, A., Gaag, I., Zapf, J., Froesch, E.R., 1983. Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally

occurring canine diabetes and acromegaly. Acta Endocrinologica (Copenhagen) 104, 167-176.

Fall, T., Hamlin, H.H., Hedhammar, A., Kämpe, O., Egenwall, A., 2007. Diabetes mellitus in a population of 180,000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. Journal of Veterinary Internal Medicine 21, 1209-1216.

Fall, T., Kreuger, S.J., Juberget, A., Bergström, A., Hedhammar, A., 2008. Gestational diabetes mellitus in 13 dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine 22, 1296-1300.

Fall, T., Hedhammar, A., Wallberg, A., Fall, N., Ahlgren, K.M., Hamlin, H.H., Lindblad-Toh, K., Andersson, G., Kämpe, O., 2010. Diabetes Mellitus in Elkhounds is associated with diestrus and pregnancy. Journal of Veterinary Internal Medicine 24, 1322-1328.

Feldman, E.C., Nelson, R.W. (Eds.), 2004. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3rd ed. Saunders, Missouri, 1088 pp.

Guptill, L., Glickman, L., Glickman, N., 2003. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records. The Veterinary Journal 165, 240-247.

Imamura, T., Koffler, M., Helderman, J.H., Prince, D., Thirlby, R., Inman, L., Unger, R.H., 1988. Severe diabetes induced in subtotally depancreatized dogs by sustained hyperglycemia. Diabetes 37, 600-609.

Noakes, D.F., Dhaliwal, G.K., England, G.C., 2001. Cystic endometrial hyperplasia/pyometra in dogs: a review of the causes and patogenesis. Journal of Reprodution Fertillity Supplement 57, 395-406.

Klinkenberg, H., Sallander, M.H., Hedhammar, A., 2006. Feeding, exercise and weight identified as risk factors in canine diabetes mellitus. Journal of Nutrition 136, 1985S-1987S.

Krook, L., Larsson, S., Rooney, J.R., 1960. The interrelationship of diabetes mellitus, obesity and pyometra in the dog. American Journal of Veterinary Research 21, 120-124.

Phillips, P.J., 2006. Gestational diabetes. Worth finding and actively treating. Australian Family Physician 35, 701-703.

Pöppl, A.G., Lasta, C.S., González, F.H.D., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2009. Insulin sensitivity indexes in female dogs: effect of estrus cycle and pyometra. Acta Scientiae Veterinariae 37, 341-350.

Pöppl, A.G., Valle, S.C., González, F.H.D., Beck, C.A.C., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2012. Estrus cycle effect on muscle tyrosine kinase activity in bitches. Veterinary Research Communications 36, 81-84.

Ryan, E.A., Enns, L., 1988. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 67, 341-347.

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, 169-180.

Selman, P.J., Mol, J.A., Rutterman, G.R., Rijnberk A., 1994. Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. Endocrinology 134, 287-292.

Tilg, H., Moschen, A.R., 2008. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. Molecular Medicine 14, 222-231.

Wejdmark, A.K., Bonnet, B., Hedhammar, A., Fall, T., 2011. Lifestyle risk factors for progesterone-related diabetes mellitus in Elkhounds – a case-control study. Journal of Small Animal Practice 52, 240-245.

Wilkinson, J.S., 1960. Spontaneous diabetes mellitus. Veterinary Record 72, 548-555.

Table 1. Breed distribution, age, body score and body weight identified in the case series at diagnosis, followed by description of the interval between estrus and CDM diagnosis, glucose values at diagnosis and at remission, interval between CDM diagnosis and gonadectomy, interval between gonadectomy and CDM remission and progesterone-related conditions for each patient.

Breed, Age, BS (1-5) and BW (kg)	E-DM (weeks)	FGD (mg/dL)	DM-OHE (days)	OHE-NG (days)	FGR (mg/dL)	P4-related condition
1) Teckel, 12y, 2, 5.2	4	493	46	39	78	CEH-P
2) Beagle, 8y, 3, 11.7	5	513	37	20	109	CEH-P
3) Brittany, 6y, 3, 10	2	542	5	4	96	Pregnancy
4) Poodle, 8y, 2, 4	2	>600	81	10	95	CEH-P
5) Mongrel, 7y, 2, 36	2	>600	3	4	89	ORS
6) Mongrel, 10y, 2, 29.8	3	305	-	-	76	Diestrus

BS: body score, BW: body weight, E-DM: interval between the end of estrus and diabetes diagnosis, FGD: fasting glucose at diagnosis, DM-OHE: interval between diabetes diagnosis and gonadectomy, OHE-NG: interval between gonadectomy and normoglycemia, FGR: fasting glucose at diabetes remission, P4: progesterone, CEH-P: cystic endometrial hyperplasia-pyometra, ORS: ovarian remnant syndrome.

4.3 Manuscrito 3

Analytic accuracy of risk factors for canine diabetes mellitus and survival after its diagnosis

A.G. Pöppl[a*], B. Meyrer[a], H. Hein[b], L.G. Corbellini[b] & F.H.D. González[a]

[a] *Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVet), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.*

[b] *Laboratório de Epidemiologia (EpiLab), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.*

* Corresponding author: Tel: +55 51 33088033; Fax: +55 51 33086112.

E-mail: gomespoppl@hotmail.com (A.G. Pöppl)

ABSTRACT

Many risk factors have been described for canine diabetes mellitus (CDM) development. A questionnaire to evaluate exposure to risk factors for CDM and survival after its diagnosis was developed and applied to diabetic dogs owners. To determine sensitivity, specificity, and kappa coefficient, answers were compared with standardized medical records of the patient's first veterinary visit. There was a mean level of agreement per question of 95% (65-100%), with all kappa values ($P < 0.05$) greater than 0.81, except for questions that evaluated overweight (0.57) and diestrus (0.38), with a mean level of agreement per questionnaire of 92% (72 to 100%). Mean survival time of dead patients was 24.4 months (1-120 months). High exposure to unbalanced diet (70.9%), overweight (76.3%), diestrus (68%) and pancreatitis (20%) before diagnosis were identified. The questionnaire was assumed as a reliable tool in evaluating exposure to risk factors for the development of CDM.

Keywords: overweight, unbalanced diet, diestrus, pancreatitis, questionnaire

1. Introduction

Canine diabetes mellitus (CDM) is one of the most common endocrinopathies in clinical practice, and it can be classified into insulin-deficient diabetes mellitus (IDDM), or insulin-resistant diabetes mellitus (IRDM) (Rand et al., 2004; Catchpole et al., 2005). Although genetics plays a major role in the development of CDM (Guptill et al., 2002; Catchpole et al., 2008), a broad array of environmental risk factors have been associated with the disease. Factors such as diestrus or gestation, high-calorie diet (abuse of dog treats, unbalanced homemade diet, or homemade diet plus commercially prepared food), in addition to overweight, have been described as risk factors for the development of CDM (Guptill et al., 2002; Pöppl and González, 2005;

Fall et al., 2010; Wejdmark et al., 2011), whereas regular and intense physical activity has been regarded as a protective factor (Klinkenberg et al., 2006).

In humans, genetic and nutritional factors, sedentary lifestyle, overweight, and chronic infections (e.g., periodontitis) are widely known risk factors for IRDM (Ryan et al., 2003; Klinkenberg et al., 2006; Catchpole et al., 2008; King, 2008). In felines, periodontal disease and chronic use of corticosteroids have been implied in the development of IRDM (Lederer et al., 2003). On the other hand, assessing the accuracy of tools used in these referenced studies is of utmost importance given that data are often subject to information biases (Del Greco et al., 1987; Werneck and Almeida, 2009; Heuberger and Wakshlag, 2011), especially when evaluating risk factors in an unknown population.

The aims of this study were to assess the sensitivity and specificity (accuracy) of a questionnaire used to evaluate the exposure of diabetic dogs to risk factors and to obtain descriptive data about survival and exposure to possible risk and protective factors in a population of diabetic dogs.

2. Material and methods

2.1 Questionnaire design

A multiple choice questionnaire containing 18 questions, based on previously validated questionnaires, was devised to evaluate different factors (Slater et al., 1995; Sallander et al., 2001; Slater et al., 2001; Fall et al., 2010; Wejdmark et al., 2011). Despite the multiple choice design, all the answers were converted to dummy (dichotomous) variables showing exposure or non-exposure to the analyzed factor. The first part of the questionnaire, related to nutritional factors, contained four questions on: 1) the type of diet (commercially prepared, homemade, or commercially prepared + homemade), 2) frequency of meals a day, 3) frequency of exposure to pet

treats (biscuits, bully sticks, rawhide chews, flat sticks, chocolate for dogs) and 4) frequency of exposure to “table scraps” (treats given during the owners’ meals like cold cuts, bread, meats, fat, chocolate, ice-cream, salty snacks, cookies or crackers, popcorn). Those animals fed commercially prepared food + homemade food or exclusively homemade food, those with three or more meals a day and those fed treats every day or more than once a day were considered to be exposed.

The second part of the questionnaire, related to factors such as physical activity and body condition, contained another four questions: 5) level of activity of the animal, 6) mean frequency of walks, 7) frequency of exposure to intense physical activity (running, walking longer than 30 minutes, following the owner on a bike, agility training, guard or hunting dog training, games with a ball or similar toys for over 20 minutes) and 8) owner’s perception about the dog’s body condition before the diagnosis of diabetes (cachectic, thin, ideal weight, overweight, or obese). Inactive animals were deemed to be exposed, as well as those which were overweight or obese. Walking and frequent physical activity are considered protective factors, and dogs walked more than once weekly and submitted to intense physical activity at least once a week were considered to be protected.

The third set of four questions assessed factors related to oral health, such as: 9) owner’s perception about the presence of dental calculus, 10) owner’s perception about the presence of halitosis, 11) how often the owner brushed his/her dog’s teeth and 12) how often the dog was exposed to dental prophylaxis under anesthesia. Patients with halitosis or severe calculi (classified as absent, mild, or severe) were considered to be exposed. Toothbrushing and dental prophylaxis are assumed to be protective factors, and therefore, patients whose teeth were brushed at least once a

month and submitted to at least one prophylaxis under general anesthesia in their lifetime are considered to be protected.

The final set of questions assessed factors related to sexual activity, such as: 13) history of castration before the diagnosis of diabetes, 14) frequency of use of progestogens, 15) regularity of the estrus cycle and 16) time elapsed between the last heat and the diagnosis of diabetes. Neutered dogs were those castrated before the diagnosis. The questions about the estrus cycle were asked only to owners of female dogs, and bitches with at least one administration of progestogen before the diagnosis were considered to be exposed, whereas exposure to irregular estrus cycles was assumed as inability of the owner to predict the patient's interestrous interval due to unsynchronized estrus. Exposure to diestrus was assumed as heat within a period of three months or less before the diagnosis of DM.

Finally, two more questions were asked: 17) about the history of pancreatitis prior to the diagnosis of diabetes and 18) about the frequency of exposure to exogenous glucocorticoids (given orally, by injection, intraconjunctivally or by ear drops). Patients with history of pancreatitis were deemed to be exposed to pancreatitis whereas those with history of frequent use of corticosteroids given by any route of administration were considered to be exposed to exogenous glucocorticoids. Information such as age at diagnosis of diabetes, sex, breed, and in the case of death, time in months between the diagnosis of diabetes and death, was also recorded.

2.2 Patients

The medical records from the Division of Endocrinology of the Clinical Veterinary Hospital of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and from a private clinic of endocrinology in Porto Alegre and metropolitan area were used for the selection of patients. Some patients from the Veterinary Hospital of Universidade

Federal de Santa Maria (UFSM) were also assessed. All owners of diabetic dogs which were treated between 2004 and 2011 were invited to participate in the study. Diabetic patients with hyperadrenocorticism or concomitant hypothyroidism were not included in the study.

2.3 Interview process

Dog owners were contacted by e-mail or telephone about the research project and informed that they would be contacted by telephone to answer the questionnaire. At the time of telephone contact, after a brief explanation about the project, the owner was asked about his/her willingness to answer the questionnaire and what the best time for that was. In those cases in which the owner was not available to answer the questionnaire during the first telephone contact, another date was scheduled for a second contact. All interviews were carried out by three final-year undergraduates in veterinary medicine. Both the interviewers and dog owners were not informed about the hypotheses of the research (double-blind approach), but were only told that the research was about the patient's lifestyle. Before the interviews, the interviewers were taught how to conduct the interview, reading out the questions and then the multiple-choice answers. Dog owners were asked to choose the alternative that best described the dog's lifestyle before the diagnosis of diabetes. All interviewers were supervised during the first interviews and sporadically later on during the subsequent ones, which took 5 to 10 minutes, according to the interviewees' eloquence.

2.4 Statistical analysis

After the questionnaires were answered, they were compared with the medical records of the patient's first veterinary visit, allowing for the comparison of the answers with the records, given that anamnesis and physical examination during the first veterinary visit are standardized and include the analysis of the variables

investigated in this study based on the information provided by the owner. To determine exposure to the factor being studied, the information on the medical record of each patient was used as gold standard. The level of agreement per question and the level of agreement per questionnaire were determined. Questionnaire answers were compared with medical record information using the kappa coefficient (*K*) and the SPSS 10.1 software. The *K* intervals were classified according to Luiz (2009) into poor (0-0.2), fair (0.21-0.4), moderate (0.41-0.6), substantial (0.61-0.8) and almost perfect (0.81-1). In addition, sensitivity (true positives) and specificity (true negatives) per question were determined with a 95% confidence interval. A 5% significance level was used. Sensitivity was defined as the percentage of owners whose positive answer to a given aspect of a given question was confirmed by the comparison with the patient's medical records, thus representing the true positives. Specificity was defined as the percentage of owners whose negative answer about a given aspect of a given question was confirmed by the comparison with the patient's medical records, thus representing the true negatives. The Kaplan-Meier estimator (Pereira and Lousada-Neto, 2009) was used for the analysis of survival rates after the diagnosis.

2.5 Ethical approval

This study was approved by the Veterinary Research Committee (COMPESQ-VET) of the School of Veterinary Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), and by the Ethics Committee on Animal Use in Research of UFRGS – protocol 18336.

3. Results

Of a total of 120 diabetic dogs selected for the study, 110 participated in the research after their owners' agreement to answer the questionnaire. Of the 10 owners who did not participate, seven could not be contacted (because they changed their

phone number and/or address) and three refused to participate for different reasons. Of the 110 completed questionnaires, 94 were compared with the records of the first veterinary visit. Sixteen questionnaires were not used for accuracy analysis either because the records of the first veterinary visit could not be found (n=7) or because it was incomplete (n=9). Among the participants, 63 patients were from private clinics in Porto Alegre and metropolitan area, 41 from UFRGS and 6 from UFSM.

A total of 23 breeds were identified in this population (Table 1), but cross-breds and poodles were the most prevalent ones (58.17% of the total). The age mean, mode and also median were 10 ± 2.6 years (3 to 15 years). Moreover, of the 110 patients, 81 were female (74%). At the time of the questionnaire, 58 patients (53%) had already died, and five of them (4.5%) lived only for some days (1 to 5 days) after the diagnosis of diabetes, and six (6.6%) lived less than one month after the diagnosis (1 to 3 weeks). Of the remaining 46 patients who had died before the interview process and which had lived for at least more than one month after the diagnosis, the mean life expectancy was 24.4 months (1 to 120 months), with a median of 18 months and a mode of 3 months. On the other hand, of the 52 patients which were alive at the time of the interview, the mean survival rate from diagnosis to the end of the follow-up period (censored) was 31.8 months (11 to 96 months) with a median and a mode of 27 months. Figure 1 shows the Kaplan-Meier graph with the survival curve of dead patients at the time of the interview (lifeless), and the survival estimation curve jointly analyzing the survival of living patients at the time of the interview (censored), showing an estimate of the mean life expectancy of 1,020 days (50% of living patients after 1,020 days from the diagnosis).

With respect to the exposure to the investigated risk factors, Table 2 shows the percentage exposure of patients to each factor. As to the accuracy of the questionnaire,

Table 3 shows the level of agreement, sensitivity and specificity with their respective 95% confidence intervals, *K* value and p value for each question. The owners were consistent in most of their answers, with a mean level of agreement per question of 94% (65-100%) and a mean level of agreement per questionnaire of 92% (72-100%). The *K* values per question ranged from 0.78 to 1.0 (Figure 2), which was regarded as good to very good, except for questions 8 and 16, which yielded a moderate to reasonable *K* (0.57 and 0.38, respectively), all with $P < 0.003$. The mean sensitivity per question was 88% (44-100%), whereas the mean specificity was 98% (93-100%). In those questions with a small number of occurrences, broader 95% confidence intervals were obtained for sensitivity and specificity. To assess the internal consistency of the questionnaire, the correlation between the answers to questions 9 and 10 was established. These questions were about tartar and halitosis, respectively, with a *K* value of 0.49.

4. Discussion and conclusions

The application of questionnaires to owners for collection of information about the lifestyle of their dogs has been increasingly used (Slater et al., 1995; Slater et al., 2001; Pöppl and González, 2005; Yazbek and Fantoni, 2005; Klinkenberg et al., 2006; German et al., 2011; Heuberger and Wakshlag, 2011; Wejdmark et al., 2011; White et al., 2011). The validity of a questionnaire, often used in clinical trials, means correctly measuring what it is supposed to. In other words, the efficiency in obtaining correct information about a given subject that allows comparing the answers with a gold standard (Del Greco et al., 1987). In this respect, determining the accuracy of these tools is crucial for the validation of its use as a tool for obtaining data for future research (e.g., case control studies), as this type of analysis is usually liable to information biases (Heuberger & Wakshlag 2011).

Although the stage that preceded the collection of information was time-consuming, contacting the owners by e-mail to tell them about the research project, informing that they would be called up and answer a questionnaire, and asking them about the best time for application of the questionnaire were assumed to be positive, resulting in a high rate of participation (Sallander et al., 2001). The fact that most patients had detailed and standardized medical records for their first veterinary visit allowed the proper comparison of questionnaire results with the information provided by owners during the first medical visit. The comparison of answers with patient diaries previously filled out by the owners (Slater et al., 1995; Sallander et al., 2001) was not possible as most cases were prevalent, and in incident cases, radical changes in the routine were recommended after the diagnosis (Feldman and Nelson, 2004). By assuming the medical record information as gold standard for determination of exposure to different factors, the recall bias can be averted, as many patients had developed diabetes some years before the application of the questionnaire. Furthermore, this procedure allowed assessing the accuracy of the questionnaire (Del Greco et al., 1987; Werneck and Almeida, 2009).

The breeds most frequently identified in this study are the most popular in our region and also the most prone to the development of diabetes, especially poodles, even though the prevalence rates of canine diabetes in different regions is affected by fads and local preferences (Hoenig, 2002; Guptill et al., 2003; Fracassi et al., 2004; Catchpole et al., 2005; Fall et al., 2007). In a previous study conducted in the same region, the higher prevalence of cross-breds and poodles was also observed (Pöppl and González, 2005). The higher prevalence of diabetic females is in line with previous reports, and so is the mean age at diagnosis (around 10 years of age) (Guptill et al., 2003; Catchpole et al., 2005; Pöppl and González 2005; Fall et al., 2007). Because of

that and due to the fact that some genetic factors related to the development of diabetes in dogs have been discovered recently (Catchpole et al., 2008), it is extremely recommended that future case-control studies be matched by breed, sex, and age.

Studies on survival rates of diabetic dogs are scarce, but the first months after diagnosis are the most critical to the patients (Feldman and Nelson, 2004), which is evidenced by the Kaplan-Meier graph (Fig. 1.). Of the patients that had died before the questionnaire was applied, 15% died at least one month after the diagnosis and the accumulated death rate reached 38.5% at six months. The only study available in the literature on this issue (Fall et al., 2007) reported a mean survival rate of 57 days (95%CI 27 to 100 days). However, if we exclude the patients that did not live longer than one day after the diagnosis, the mean was equal to 2 years (95%CI 1.1 to not estimable), similarly to the one observed in the present study (24.4 months). However, these results are greatly affected by the age at which the diagnosis is made. In our study, age at diagnosis ranged from 3 to 15 years, and theoretically, a patient diagnosed at the age of 3 years has a higher life expectancy than one diagnosed at 15 years, regardless of the presence of the diabetes factor.

Important findings could be described in this case series, such as the high exposure of these patients to factors like unbalanced diet (70.9%), overweight (76.3%), diestrus (68%) and pancreatitis (20%) prior to diagnosis. Diabetes mellitus is a complex disease and it is certainly multifactorial (Feldman and Nelson, 2004; Rand et al., 2004; Catchpole et al., 2005; Wejdmark et al., 2011). Figure 3 shows a hypothetical causal diagram based on the literature review on dogs and humans.

An unbalanced diet, characterized by feeding the dog a commercially available diet + homemade food, or exclusively unbalanced homemade food, is associated with a high-calorie diet containing carbohydrates and fat (Bland and Guthrie-Jones, 2009),

predisposing to obesity (German, 2006). Exposure to this type of diet was associated with lower glucose tolerance secondary to reduction in the beta-pancreatic cell activity (Kaiyala et al., 1999), being also associated with larger appetite due to the lower insulin transport to the central nervous system (Kaiyala et al., 2000), which highlights unbalanced diet as a risk factor for obesity and diabetes. As to the frequency of meals, several studies have demonstrated that two meals a day can be ideal for dogs and that three or more meals a day may be associated with weight gain and obesity (Slater et al., 1995; Sallander et al., 2001; Bland and Guthrie-Jones, 2009). The abuse of veterinary or human treats (table scraps) are predisposing factors for weight gain (German, 2006; Sallander et al., 2001; Bland and Guthrie-Jones, 2009; German et al., 2011; Heuberger and Wakshlag 2011), being also implicated as risk factors for the development of diabetes (Klinkenberg et al., 2006).

In the validation of the questionnaire, the questions about these factors, despite good and very good *K* values (Table 3), showed smaller sensitivity (questions 1, 3 and 4, about the type of diet and abuse of treats). As diabetes is frequently discussed in the mass media, some owners might have been evasive in their answers (evasive answer bias) as they perceived that over-treating their dogs played some role in the development of diabetes. Conversely, the lack of agreement detected as to the frequency of meals could result from a recall bias, as after the diagnosis diabetic dogs must be fed only twice daily in the treatment regimen adopted in our setting (Feldman and Nelson, 2004).

Canine obesity is associated with different factors such as genetics (small and medium-sized breeds are more vulnerable), reproductive management (predisposition to weight gain after castration) and nutritional and physical management through the positive balance between calorie intake and energy expenditure (German, 2006; Bland

and Guthrie-Jones, 2009). The association between high body condition scores (overweight/obesity) in adult life and the development of diabetes has been documented in dogs for over 50 years (Krook et al., 1960; Pöppl and González, 2005; Klinkenberg et al., 2006; Wejdmark et al., 2011). Nevertheless, although it is an important factor involved in the pathogenesis of type II diabetes in humans and in felines, no study has demonstrated how obesity can cause diabetes in dogs (Rand et al., 2004).

Studies have shown over the years that obese dogs have insulin resistance associated with a lower beta cell response, leading to lower glucose tolerance (Mattheeuws et al., 1984; Rand et al., 2004; German et al., 2009). Besides, the higher secretion of inflammatory adipokines and smaller secretion of adiponectin (an insulin-sensitizing adipokine) by adipocytes in response to overweight justify insulin resistance in obesity (Costa and Duarte, 2006; German et al., 2009; Kil and Swanson, 2010). Dogs exposed to chronic hyperglycemia can have beta cell depletion (glucotoxicity) and develop IDDM, and this could be a mechanism whereby diabetes develops in insulin-resistant dogs (Imamura et al., 1988). However, there is no difference between obese and lean dogs concerning basal glucose levels (Faria et al., 2005; Verkest et al., 2012). Nevertheless, Verkest et al. (2012) conclude that canine pancreatic beta cells are either not sensitive to toxicity because of mild hyperglycemia, or lack another component of the pathophysiology of beta cell failure in type II diabetes due to demonstration that obese dogs had fasting insulin sensitivity fivefold lower than lean dogs, whereas fasting beta cell function was 2.5 greater in obese than in lean dogs, associated with greater postprandial insulin, glucose and triglyceride concentration in the obese ones. In the light of this, feeding an obese dog many times a day may be more gluco and lipotoxic to beta cells.

Question 8, which assessed the presence of overweight before diagnosis, yielded the second worst *K* values and sensitivity (Table 3), probably due to the recall and confounding biases. Diabetic status causes emaciation and many patients at diagnosis no longer present with overweight (Feldman and Nelson, 2004). In addition, dog owners have difficulty assessing the body condition of their pets (Heuberger and Wakshlag, 2011; White et al., 2011) and a diagram with body score pictures facilitates the classification by the owners (Bland and Guthrie-Jones, 2009). Medical records of the prevalence of obesity prior to diagnosis in more than 75% of the patients underscore that overweight is an important risk factor for CDM.

Lack of physical exercise has been confirmed as an important predisposing factor for overweight (Slater et al., 1995; Slater et al., 2001; German, 2006; Bland and Guthrie-Jones, 2009). Notwithstanding, the level of activity was not considered to be a risk factor for diabetes, but intense regular physical activity has been regarded as a protective factor by Klinkenberg et al. (2006). Actually, sedentary dogs and cats have insulin resistance (Rand et al., 2004) and exercise practice improves insulin sensitivity, reduces blood glucose levels and helps prevent overweight (Koivisto et al., 1980; Chibalin et al., 2000; German, 2006). In comparison with the patients' medical records, the questionnaire had good sensitivity and specificity in questions 5 to 7 about the level of activity (Table 3). Even those cases in which the patient was not so active at the time of the interview as he/she was before the diagnosis, due to the development of cataracts and to aging, this change in profile is clearly stated by owners as occurring after the diagnosis of diabetes, thus minimizing a possible recall bias.

The association between oral diseases and diabetes has been widely known and described in humans as a two-way street (Taylor, 2003). Periodontitis can stimulate

insulin resistance through different mechanisms by the larger serum concentration of inflammatory interleukins (TNF-α, IL-1, IL-6) (Grimble, 2002; King, 2008; Tilg and Moshen, 2008). On the other hand, diabetic status favors the overt progression of periodontal disease by inhibiting the immune system at certain levels (Ryan et al., 2003; Ship, 2003; King, 2008; Skamagas et al., 2008). Even though periodontitis has already been defined as a risk factor for diabetes in cats (Lederer et al., 2003), studies correlating periodontitis with diabetes in dogs are restricted to case reports of periodontal disease hindering the treatment of diabetic dogs (Van Nice, 2006; Pöppl et al., 2009) or studies in the 1970s on enzyme and inflammatory activity in the gums of diabetic dogs with periodontitis (Inozheb and Anserob, 1973; Matson et al., 1980).

In the questionnaire, questions 9 to 12, about oral health, showed good overall accuracy (Table 3), as regular toothbrushing or dental prophylaxis under anesthesia are remarkable events for the owners and easy to confirm clinically by physical examination and analysis of patient records. The assessment of the presence of severe tartar and halitosis (classified as absent, mild, or severe) aimed to evaluate indirectly the presence of periodontitis, disease known to be the most prevalent among small animals, affecting over 80% of dogs older than 2 years (Niemiec, 2008), even though the assessment is subjective and subject to information bias.

Castration of males was identified as a risk factor for the development of diabetes (odds ratio 1.99 with 95%CI 1.68-2.17) as it predisposes to obesity, factor that is not observed in females (odds ratio 0.99 with 95%CI 0.89-1.12) by Guptill et al. (2003). Quite on the contrary, in females, spaying is regarded as a protective factor. The higher incidence of diabetes in females only occurs where elective spaying is not a common practice, such as in Brazil. In countries such as the United Kingdom, where females that are not suitable for reproduction are spayed at a young age, the incidence

of diabetes is similar between males and females (Catchpole et al., 2005). The reason for that is the eminent production of growth hormone (GH) by the mammary gland during diestrus, gestation or in response to the administration of exogenous progestogens (Eigenmann et al., 1983; Selman et al., 1994). In addition to the influence of progesterone on the binding of insulin to its receptor, and to the reduced phosphorylation of the insulin receptor in response to progesterone (Ryan et al., 1988), GH causes insulin resistance through multiple mechanisms in the crosstalk between the intracellular communication pathways of GH and of insulin signaling (Dominici et al., 2005). Question 13, closed and dichotomous, for the detection of exposure or not to castration before the diagnosis of diabetes revealed excellent questionnaire accuracy (Table 3).

With respect to diestrus, this association was confirmed in 34 of 50 patients which had not been spayed before the diagnosis. Unanswered questions (10) and those in which no agreement was achieved demonstrate recall and information biases, as this is a specific aspect that is hardly recognized and not properly recorded by owners, yielding a reasonable *K* value, with poor sensitivity when applied to prevalent cases. This high incidence of diabetes during diestrus (68%) is in line with previous studies which demonstrated insulin resistance during diestrus (Eigenmann et al., 1983; Selman et al., 1994; Scaramal et al., 1997; Fukuta et al., 2012) or higher incidence of diabetes during this phase of the estrous cycle (Pöppl and González, 2005; Fall et al., 2010). The effect of diestrus on insulin sensitivity is so pronounced that in Elkhound dogs CDM occurs almost exclusively in females during diestrus or in pregnant dogs (Fall et al., 2010), and obesity is an important risk factor in these animals, with an odds ratio of 2.8 with 95%CI 1.1 – 7.5 (Wejdmark et al., 2011).

Although at least approximately 50% of diabetic dogs have autoantibodies against the islets of Langerhans and beta cells (immune-mediated insulitis), pancreatitis is assumed as a cause of IDDM in about 28% of diabetic dogs due to extensive pancreatic lesion secondary to chronic pancreatitis (Rand et al., 2004), a rate that is similar to that of the previous history of pancreatitis observed in this study (20%). While pancreatitis is a remarkable event in the life of a dog, the question about this risk factor was subject to recall bias, shown by its poor sensitivity (Table 3), but with a good *K* value. Hypertriglyceridemia is considered to be a risk factor for the development of pancreatitis, and calorie-rich foods, overweight/obesity and diabetic status can cause hypertriglyceridemia, which reinforces these interactions in the pathogenesis of canine diabetes (Feldman and Nelson, 2004; Rand et al., 2004). The chronic use of corticosteroids potentially induces hypertriglyceridemia and peripheral resistance to insulin, and therefore, endogenous hypercortisolism (Cushing's syndrome, active corticoadrenal tumor) is an important risk factor for the development of canine diabetes (Fall et al., 2007). Quite often, permanent IDDM is observed in patients on exogenous glucocorticoids, which makes one suspect that glucocorticoid therapy may have been the final triggering factor of diabetic status in patients predisposed for other reasons (Jeffers et al., 1991; Feldman and Nelson, 2004). However, this was less frequent in the present study. The question that assessed exposure to glucocorticoids was subject to recall and information biases, shown by poor sensitivity, as owners cannot remember whether their dogs were medicated in the past for some condition or do not know whether a glucocorticoid has been used.

Canine diabetes mellitus has several important environmental triggering factors such as unbalanced diet, overweight and diestrus, and has a considerable morbidity rate and high mortality. The assessment of the questionnaire as a tool to evaluate the

exposure of patients to risk or protective factors for the development of diabetes has proved useful and accurate, but when interpreting the results, it is important to consider that overweight and diestrus are more susceptible to recall and confounding biases, if applied to prevalent cases.

5. Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This study was funded by CNPq (Brazilian National Research Council).

References

Bland, I.M., Guthrie-Jones, A., Hill T.J., 2009. Dog obesity: owner attitudes and behavior. Preventive Veterinary Medicine 92, 333-340.

Catchpole, B., Kennedy, L.J., Davison, L.J., Ollier, W.E.R., 2008. Canine diabetes mellitus: from phenotype to genotype. Journal of Small Animal Practice 49, 4-10.

Catchpole, B., Ristic, J.M., Fleeman, L.M., Davison, L.J., 2005. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? Diabetologia 48, 1948-1956.

Chibalin, A.V., Yu, M., Ryder, J.W., Song, X.M., Galuska, D., Krook, A., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R., 2000. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. Proceedings of the National Academy of Sciences from United States of America 97, 38-43.

Costa, J.V., Duarte, J.S., 2006. Tecido adiposo e adipocitocinas. Acta Medica Portuguesa 19, 251-256.

Del Greco, L., Walop, W., McCarthy, R.H., 1987. Questionnaire development: 2. Validity and reliability. Canadian Medical Association Journal 136, 699-700.

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 Horm & IGF Research 15, 324-336.

Eingenmann, J.E., Eingenmann, R.Y., Rijinberk, A., Gaag, I., Zapf, J., Froesch, E.R., 1983. Progesterona-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. Acta Endocrinologica 104, 167-176.

Fall, T., Hamlin, H.H., Hedhammar, A., Kämpe, O., Egenwall, A., 2007. Diabetes mellitus in a population of 180,000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. Journal of Veterinary Internal Medicine 21, 1209-1216.

Fall, T., Hedhammar, A., Wallberg, A., Fall, N., Ahlgren, K.M., Hamlin, H.H., Lindblad-Toh, K., Andersson, G., Kämpe, O., 2010. Diabetes Mellitus in Elkhounds is associated with diestrus and pregnancy. Journal of Veterinary Internal Medicine 24, 322-1328.

Farias, P.F., Araújo, D.F., Soto-Blanco, B., 2005. Glicemia em cães obesos e senis. Acta Scientiae Veterinariae 33, 47-50.

Feldman, E.C., Nelson, R.W. (Eds), 2004. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3rd. Saunders, Missouri, 1089pp.

Fracassi, F., Pietra, M., Boari, A., Aste, G., Giunti, M., Famigli-Bergamini, P., 2004. Breed distribution of canine diabetes mellitus in Italy. Veterinary Research Communications 28, 339-342.

Fukuta, H., Mori, A., Urumuhan, N., Lee, P., Oda, H., Saeki, K., Kurushima, M., Nozawa, S., Mizutani, H., Mishina, S., Arai, T., Sako, T., 2012. Characterization

of insulin resistance induced by cushing syndrome or diestrus against healthy control dogs as determined by euglycemic-hyperinsulinemic glucose clamp profile glucose infusion rate using an artificial pancreas apparatus. The Journal of Veterinary Medical Science Jul 6, in press.

German, A.J., 2006. The growing problem of obesity in dogs and cats. Journal of Nutrition 136(Suppl), 140-146.

German, A.J., Hervera, M., Hunter, L., Holden, S.L., Morris, P.J., Biourge, V., Trayhurn, P., 2009. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weigth loss in obese dogs. Domestic Animal Endocrinology 37, 214-226.

German, A.J., Holden S.L., Gernon L.J., Morris P.J., Biourge V., 2011. Do feeding practices of obese dogs, before weigth loss, affect the success of weigth management? British Journal of Nutrition 106, S97-S100.

Grimble, R.F., 2002. Inflammatory status and insulin resistance. Current Opinion on Clinical Nutrition and Metabolism Care 5, 551-559.

Guptill, L., Glickman, L., Glickman, N., 2003. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records. The Veterinary Journal 165, 240-247.

Heuberger, R., Wakshlag J., 2011. The relationship of feeding patterns and obesity in dogs. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 95, 98-105.

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

Imamura, T., Koffler, M., Helderman, J.H., Prince, D., Thirlby, R., Inman, L., Unger, R.H., 1988. Severe diabetes induced in subtotally depancreatized dogs by sustained hyperglycemia. Diabetes 37, 600-609.

Inozheb, B., Anserob, E.M., 1973. Activity of some enzymes in the gingiva of dogs with alloxan diabetes. Stomatologiia (Sofiia) 55, 7-11.

Jeffers, J.G., Shanley, K.J., Schinck, R.O., 1991. Diabetes mellitus induced in a dog after administration of corticosteroid and methylprednisolone pulse therapy. Journal of the American Veterinary Medical Association 199, 77-80.

Kaiyala, K.J., Prigeon, R.L., Kahn, S.E., Woods, S.C., Porte, T., Schwartez, M.W., 1999. Reduced β-cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese with a high-fat feeding. American Journal of Physiology 277, E659-E667.

Kaiyala, K.J., Prigeon, R.L., Kahn, S.E., Woods, S.C., Schwartez, M.V., 2000. Obesity induced by a high-fat diet is asscociated with reduced brain insulin transport in dogs. Diabetes 49, 1525-1533.

Kil, D.Y., Swanson, K.S., 2010. Endocrinology of obesity. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 40, 205-219.

King, G.L., 2008. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. Journal of Periodontology 79, 1527-1534.

Klinkenberg, H., Sallander, M.H., Hedhammar, A., 2006. Feeding, exercise and weight identified as risk factors in canine diabetes mellitus. Journal of Nutrition 136(Suppl), 1985-1987.

Koivisto, V., Soman, V., Nadel, E., Tamborlane, W.V., Felig, P., 1980. Exercise and Insulin: insulin binding, insulin mobilization, and counterrregulatory hormone secretion. Federation Proceedings 39, 1481-1486.

Krook, L., Larsson, S., Rooney, J.R., 1960. The interrelationship of diabetes mellitus, obesity and pyometra in the dog. American Journal of Veterinary Research 21, 120-127.

Lederer, R., Rand, J.S., Hughes, I., Fleeman, L.M., 2003. Chronic or recurring medical problems, dental disease, repeated corticosteroid treatment, and lower physical activity are associated with diabetes mellitus in Burmese cats. Journal of Veterinary Internal Medicine 17, 433.

Luiz, R.R., 2009. Métodos estatísticos em estudos de concordância. In: Medronho, R.A., Bloch, K.V., Luiz, R.R., Werneck, G.L. (Eds.), Epidemiologia. 2.ed. Atheneu, São Paulo, pp. 343-369.

Matsson, L., Attstrom, R., Granath, L., 1980. Inflammatory reactions in the gingival region during the development of bacterial plaque in alloxan-diabetic dogs. Journal of Periodontal Research 15, 516-524.

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.

Niemiec, B.A., 2008. Peridontal disease. Topics in Companion Animal Medicine 23, 72-80.

Pereira, B.B., Louzada-Neto, F., 2009. Análise de sobrevida. In: Medronho, R.A., Bloch, K.V., Luiz, R.R., Werneck, G.L. (Eds.), Epidemiologia. 2.ed. Atheneu, São Paulo, pp. 485-492.

Pöppl, A.G., González, F.H.D., 2005. Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. Acta Scientiae Veterinariae 33, 33-40 (In Portuguese, with English abstract).

Pöppl, A.G., Müller, F., Queiroga, L., Oliveira I., 2009. Insulin resistance due to periodontal disease in an old diabetic female poodle. Clínica Veterinária Ano XIV(Suppl), 116.

Rand, J.S., Fleeman, L.M., Farrow, H.A., Appleton, D.J., Lederer, R., 2004. Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture? Journal of Nutrition 134(Suppl), 2072-2080.

Ryan, E.A., Enns, L., 1988. Role of gestacional hormones in the induction of insulin resistance. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 67, 341-347.

Ryan, M.E., Carnu, O., Kamer, A., 2003. The influence of diabetes on the periodontal tissues. Journal of Amercian Dental Association 134, 34S-40S.

Sallander, M.H., Hedhammar, A., Rundgren, M., Lindberg, J.E., 2001. Repeatability and validity of a combined mail and telephone questionnaire on demographics, diet, exercise and heath status in an insured-dog population. Preventive Veterinary Medicine 50, 35-51.

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, 169-180.

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.

Ship, J.A., 2003. Diabetes and oral health. Journal of the American Dental Association 134, 4S-10S.

Skamagas, M., Breen, T.L., LeRoith, D., 2008. Update on diabetes mellitus: prevention, treatment, and association with oral diseases. Oral Diseases 14, 105-114.

Slater, M.R., Robison, L.E., Zoran, D.L., Wallace, K.A., Scarlett, J.M., 1995. Diet and exercise patterns in pet dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 207, 186-190.

Slater, M.R., Scarlett, J.M., Donoghue, S., Erb, H.N., 2001. The repeatibility and validity of a telephone questionnaire on diet and exercise in dogs. Preventive Veterinary Medicine 13, 77-91.

Taylor, G.W., 2003. The effects of periodontal treatment on diabetes. Journal of the American Dental Association 134, 41S-48S.

Tilg, H., Moschen, A.R., 2008. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. Molecular Medicine 14, 222-231.

Van Nice, E., 2006. Management of multiple dental infections in a dog with diabetes mellitus. Journal of Veterinary Dentistry 23, 18-25.

Verkest, K.R., Rand, J.S., Fleeman, L.M., Morton, J.M., 2012. Spontaneously obese dogs exhibit greater postprandial glucose, triglyceride, and insulin concentration than lean dogs. Domestic Animal Endocrinology 42, 103-112.

Wejdmark, A.K., Bonnet, B., Hedhammar, A., Fall, T., 2011. Lifestyle risk factors for progesterone-related diabetes mellitus in Elkhounds – a case-control study. Journal of Small Animal Practice 52, 240-245.

Werneck, G.L., Almeida L.M., 2009. Validade em estudos epidemiológicos. In: Medronho, R.A., Bloch, K.V., Luiz, R.R., Werneck, G.L. (Eds.), Epidemiologia. 2.ed. Atheneu, São Paulo, pp. 275-288.

White, G.A., Hobson-West, P., Cobb, K., Graigon, J., Hammond, R., Millar, K.M., 2011. Canine Obesity: is there a difference between veterinarian and owner perception? Journal of Small Animal Practice 52, 622-626.

Yazbek, K.V.B., Fantoni D.T., 2005. Validity of a health-related quality of-life scale for dogs with pain secondary to cancer. Journal of the American Veterinary Medical Association 226, 1354-1358.

Table 1. Diabetic dog breeds prevalence in the study.

Breed	n	(%)
Mongrel	37	33.6
Poodle	27	24.5
Cocker Spaniel	6	5.5
Labrador Retriever	5	4.5
Pinscher, Schnauzer	4	3.6
Beagle, Dachshund, Fox Terrier, Maltese	3	2.7
Basset-Hound, Siberian Husky	2	1.8
Akita, Bichón Frisé, Boxer, Brittany, Chow-Chow, Dalmatian, Lhasa Apso, Rottweiller, Shih tzu, Weimaraner, Yorkshire Terrier,	1	0.9

Table 2. Patient exposition frequency to the different proposed risk, and protection factors, evaluated in each question.

Factor in study	Exposed/total (%)
1. Unbalanced diet (RF)[a]	78/110 (70,9)
2. Three or more meals a day (RF) [a]	44/109 (40,4)
3. Vet treats abuse (RF) [a]	47/109 (43,1)
4. "Table scraps" abuse (RF) [a]	58/109 (53,2)
5. Sedentariness (RF) [a]	42/110 (38,2)
6. Frequent walking outside (PF) [b]	65/110 (59,1)
7. Frequent intense physical activity (PF) [b]	34/110 (30,1)
8. Overweight (RF) [a]	84/110 (76,3)
9. Intense dental calculus (RF) [a]	23/109 (19,3)
10. Intense halitosis (RF) [a]	14/109 (12,8)
11. Tooth brushing (PF) [b]	33/110 (30,0)
12. Dental prophylaxis (PF) [b]	81/110 (73,6)
13. Castration	44/110 (40,0)
Males (RF) [a]	13/29 (44,8)
Females (PF) [b]	31/81 (38,3)
14. Progestogens exposure (RF) [a]	6/80 (7,5)
15. Irregular estrus cycle (RF) [a]	10/50[c] (20)
16. Diestrus (RF) [a]	34/50[c] (68,0)
17. Pancreatitis (RF) [a]	20/110 (18,2)
18. Glucocorticoids (RF) [a]	8/109 (7,3)

[a] Theoretical risk factor, [b] Theoretical protection factor, [c] Intact females

Table 3. Percentual of questionnaire agreement, sensibility and specificity (95% confidence interval), concordance Kappa value and P value for each question.

Question	Congruity (%)	Sensibility (%) (95% IC)[a]	Specificity (%) (95% IC)[a]	*Kappa* value	P value
1	85.1	90.6 (81.0 – 95.6)	100 (88.6 – 100)	0.86	< 0,001
2	94.7	92.5 (80.1 – 97.4)	98.1 (89.9 – 99.7)	0.91	< 0,001
3	88.2	83.8 (68.9 – 92.3)	94.6 (85.4 – 98.2)	0.79	< 0,001
4	91.4	91.5 (80.1 – 96.6)	100 (92.3 – 100)	0.91	< 0,001
5	94.7	96.8 (84.7 – 99.5)	93.4 (84.3 – 97.4)	0.87	< 0,001
6	98.9	100 (93.7 – 100)	100 (90.6 – 100)	1	< 0,001
7	97.9	94.1 (80.9 – 98.4)	98.3 (91.1 – 99.7)	0.93	< 0,001
8	78.7	73.9 (62.5 – 82.8)	96.0 (80.5 – 99.3)	0.57	< 0,001
9	88.3	87.5 (69.0 – 95.7)	95.7 (88 – 98.5)	0.83	< 0,001
10	100	100 (79.6 – 100)	100 (95.3 – 100)	1	< 0,001
11	100	100 (79.6 – 100)	100 (95.2 – 100)	1	< 0,001
12	98.9	96.9 (84.3 – 99.4)	100 (94.2 – 100)	0.98	< 0,001
13	97.9	100 (91.4 – 100)	98.1 (89.9 – 99.7)	0.98	< 0,001
14	98.5	75.0 (30.1 – 95.4)	100 (94.3 – 100)	0.85	< 0,001
15	94.2	83.3 (43.6 – 97.0)	98.3 (91.1 – 99.7)	0.82	< 0,001
16	64.6	44.0 (27.6 – 62.7)	92.9 (77.4 – 98.0)	0.38	0,001
17	94.2	72.2 (49.1 – 87.5)	100 (94.7 – 100)	0.8	< 0,001
18	93.2	66.7 (35.4 – 87.9)	100 (95.4 – 100)	0.78	< 0,001
Mean	92.2	86.1	98.1	0.85	
Minimun	64.6	44.4	92.9	0.38	
Maximum	100	100	100	1	

[a] 95% confidence interval

Figure Captions

Figure 1. Kaplan-Meier curves showing survival data of the lifeless patients at time the questionnaire was applied, and from all patients (lifeless + censored).

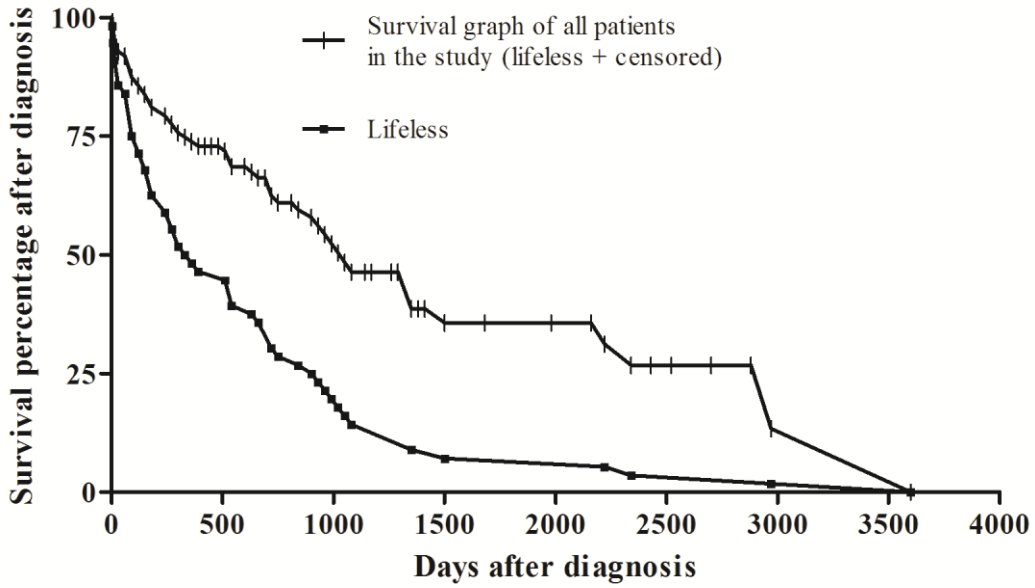


Figure 2. *Kappa* values distribution among the questionnary questions.

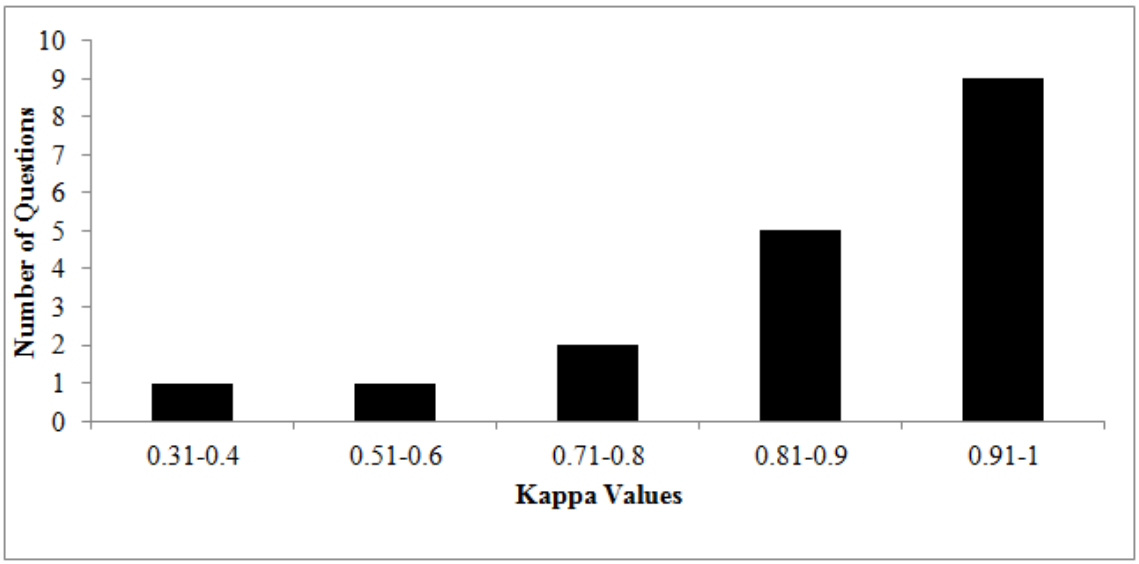
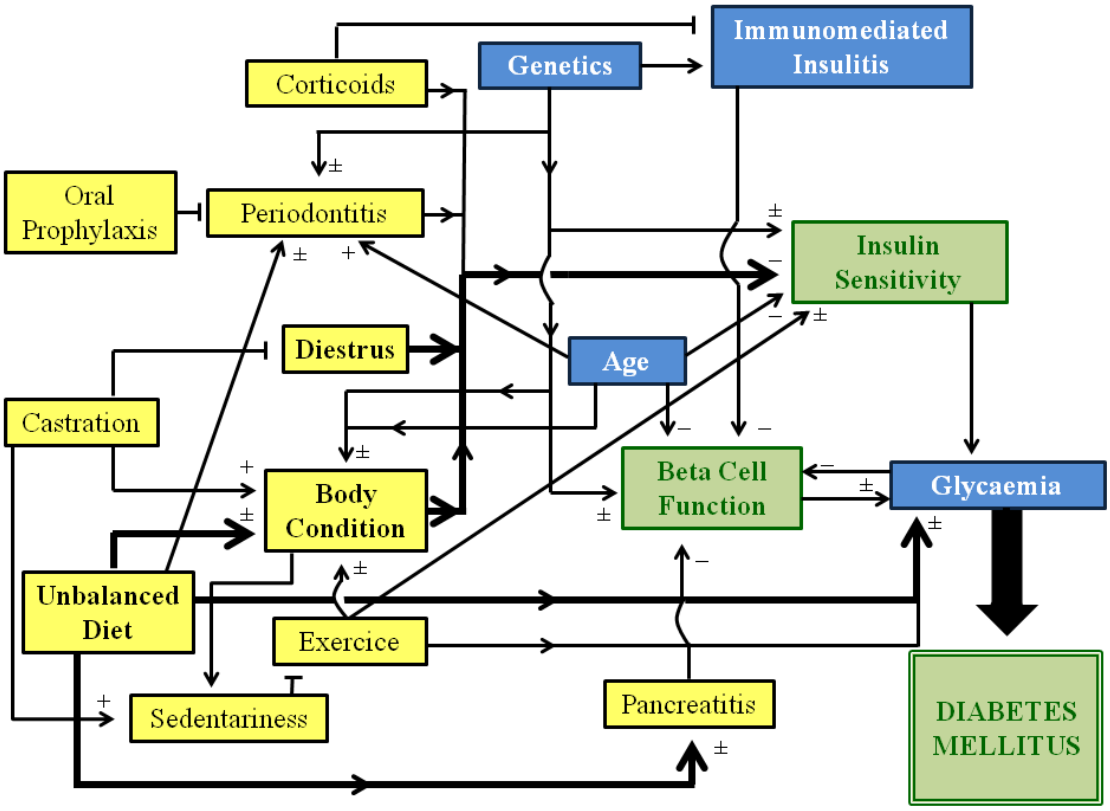


Figure 3. Hypothetical causal diagram for canine diabetes mellitus pathogenesis regarding risk factors evaluated in this study (yellow boxes). Final glycaemia determinants like beta cell function and insulin sensitivity, as well as the factors age, genetics, and immunomediated insulitis were not evaluated in this study (blue boxes). Arrowhead: influence, blind arrow: blockage, +: positive stimulus, -: negative stimulus, ±: positive or negative stimulus in conformity with individual variation. Heavy arrows: high prevalence in this study.



4.4 Manuscrito 4

A case-control study on canine diabetes mellitus risk factors

DVM., MSc., Alan Gomes Pöppl[a*], DVM., MSc., PhD. Luis Gustavo Corbellini[b] and DVM., MSc., PhD. Félix Hilário Díaz González[a]

[a] *Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVet), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.*

[b] *Laboratório de Epidemiologia (EpiLab), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.*

* Corresponding author: Tel: +55 51 3308-8033; Mobile: +55 51 9668-4995.

E-mail: gomespoppl@hotmail.com

Acknowledgements: This study was funded by CNPq (Brazilian National Research Council). We also thank the more than 200 dog owners that kindly help us agreeing answering the questionnaire.

Word count: 2998 words

Objectives: This study aims to investigate risk factors for the development of canine diabetes mellitus.

Methods: Owners of 110 diabetic dogs and 136 healthy controls matched by breed, sex, age and hospital were interviewed by phone concerning aspects related to diet, weight, physical activity, oral health, reproductive history, pancreatitis, and exposure to exogenous glucocorticoids. Two multivariate statistical models were created. The ModMF included males and females without factors related to oestrous cycle, while the ModF included only females with all analyzed factors.

Results: In the ModMF model, "unbalanced diet" (OR 4.86, 95%CI 2.2 – 10.7, $P<0.0001$) and "overweight" (OR 3.51, 95%CI 1.6–7.5, $P=0.001$) were statistically significant, while in the ModF model, "unbalanced diet" (OR 4.14, 95%CI 1.3–12.7, $P=0.01$), "abuse of table scraps" (OR 3.62, 95%CI 1.1–12.2, $P=0.03$), "overweight" (OR 3.91, 95%CI 1.2–12.6, $P=0.02$), and "dioestrus" (OR 5.53, 95%CI 1.9–16.3, $P=0.002$) were statistically significant.

Clinical Significance: This study highlights the importance of feeding dogs balanced commercial food, keeping an ideal body condition score and avoiding the abuse of treats. In addition, spaying may be a protective factor against canine diabetes mellitus development.

INTRODUCTION

Different subtypes of canine diabetes mellitus (CDM) have been described (Rand and others 2004, Cathpole and others 2005) based on their aetiopathogenesis, which are basically classified into insulin-dependent diabetes (IDD) secondary to progressive

beta cell failure, and insulin-resistant diabetes (IRD), secondary to the antagonism of insulin action by other hormones.

Even though the evidence supports that dogs often develop a subtype of diabetes similar to latent autoimmune diabetes of adults (LADA) in humans, as well as progesterone-related diabetes, or yet diabetes secondary to pancreatitis (Hoenig 2002, Rand and others 2004, Cathpole and others 2005), some environmental factors seem to be risk factors for diabetes development in many cases, such as obesity, lack of exercise, and overfeeding (Klinkenberg and others 2006), sometimes resembling type 2 diabetes in humans. However, the mechanisms leading to diabetes development secondary to overweight observed in humans and felines have not been documented in dogs (Rand and others 2004).

Although many subtypes of diabetes mellitus are recognised in dogs, this study aims to assess potential risk factors for CDM development based on previous risk factors already reported for pets and humans.

MATERIAL AND METHODS

Case selection process

All CDM cases diagnosed between 2004 and 2011 at a Small Animal Endocrinology Unit in southern Brazil were invited to participate. Owners were invited to answer an accurate questionnaire previously developed (Pöppl and others 2012a) to assess the exposure of their dogs to different risk factors before the diagnosis of CDM. The diagnosis was based upon a fasting glycaemia greater than 11 mmol/L associated with classic clinical signs. Patients with concomitant hyperadrenocorticism or hypothyroidism were not included.

Control selection process

For each diabetic dog in the study, at least one control (n:m) matched by breed, age and sex was randomly selected from the computer files of the Division of Statistical and Medical Records of the Hospital where the Endocrinology Unit is located. The owners were then contacted to answer the questionnaire. The underlying disease or reasons for the veterinary visit were not taken into account – only the fact that they had never been or were not diabetic at the time of the questionnaire.

Questionnaire

Owners were told that the questions considered the lifespan before CDM diagnosis (cases), or the actual state of the dog to avoid recall bias (controls). The questionnaires were applied by telephone by trained interviewers and the interviews lasted 5 to 10 minutes, according to the interviewees' eloquence. Despite the multiple choice design of the questionnaire, all the answers were converted to dummy (dichotomous) variables showing exposure or non-exposure to the analysed factor. To define questionnaire sensibility, specificity and Kappa values, the owner´s answers were compared in SAS with standardized medical records from the patient´s first veterinary visit (Pöppl and others, 2012a).

The "Unbalanced diet" variable was classified as feeding only homemade or homemade plus commercial food. The "excessive meals" variable was considered as feeding three or more meals a day, while the "abuse of treats" and "abuse of table scraps" variables were classified as offering treats or table scraps daily or many times a day. The "inactivity" variable was classified as owner-perceived low activity, and dogs walked more than once weekly and submitted to intense physical activity at least once a week were considered exposed to the "walk outside" and "intense physical activity" variables, respectively. A 4 or 5 owner-perceived body condition score (BCS) on a scale from 1 to 5 was regarded as exposure to the "overweight" variable.

The “halitosis” and “dental calculus” variables were classified as intense perception by the owner, while the “toothbrushing” and “dental prophylaxis” variables were classified, respectively, as toothbrushing at least once a month, and at least one prophylaxis under general anaesthesia in the dog’s lifetime.

The “castration” variable was classified as exposure to gonadectomy, while the “exposure to progestogens”, “irregular oestrus cycle” and “dioestrus” variables were investigated only in females. Those variables were classified as exposure to progestogen in the past 6 months, inability of the owner to predict the patient’s interoestrous interval due to unsynchronised oestrus and heat occurrence within a period of three months, respectively. The “pancreatitis” variable was classified as medical history of pancreatitis, while the “glucocorticoids” variable was classified as frequent owner-related use of glucocorticoids by any route.

Statistical analysis

The data were analysed by conditional logistic regression for a matched case-control design using the PHREG procedure in SAS. Two sets of models were developed: 1) ModMF, which evaluated males and females without inclusion of risk factors related to the oestrous cycle. 2) ModF, which evaluated only females including all the investigated risk factors. For each statistical model, a conditional univariate logistic regression initially selected potential risk factors for CDM. Only the variables with a P-value <0.20 were selected for inclusion in the multivariable analysis, being subsequently screened for potential collinearity by a correlation matrix. If factors were correlated (coefficients >0.8), the variable believed to be most related to the outcome was selected.

The multivariate model was built by manual forward selection with final manual backward elimination. During forward selection, each remaining variable was added to

the best previous model. During each round of model construction, the best model chosen was the one with the lowest Akaike information criterion value. The final model was adjusted using backward elimination to remove variables that had subsequently become non-significant ($P < 0.05$) during the forward selection process. The final results of the statistical models were expressed in odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI).

RESULTS

Population

Of 120 diabetic dogs selected for the study, 110 participated in the research after their owners' agreement to answer the questionnaire. Seven owners could not be contacted and three owners refused to participate for different reasons. The mean age of the cases at onset of diabetes was 10 ± 2.6 years (3 to 15 years), and at the time of the questionnaire, 58 patients (53%) had already died. From a total of 143 controls selected for the study, only seven owners refused to participate; therefore, 136 controls were eventually included after their owners' agreement to answer the questionnaire. Only one control had died at the time of the questionnaire. A total of 23 breeds were identified in this study: Mongrel (33.6%); Poodle (24.5%); Cocker Spaniel (5.5%); Labrador Retriever (4.5%); Pinscher and Schnauzer (3.6% each); Beagle, Dachshund, Fox Terrier and Maltese (2.7% each); Basset Hound and Siberian Husky (1.8% each); Akita, Bichón Frisé, Boxer, Brittany, Chow-Chow, Dalmatian, Lhasa Apso, Rottweiller, Shi Tzu, Weimaraner and Yorkshire Terrier (0.9% each).

Unisex Model

The ModMF model, including all males and females without variables related to the oestrous cycle, showed statistically significant differences ($P<0.05$) between cases and

controls in the univariate analysis (Table 1) regarding exposure to unbalanced diet, abuse of vet treats or of table scraps, as well as high BCS, which were considered to be risk factors for CDM.

Female Model

The ModF model, which consisted of 81 female cases and 104 female controls with all the investigated variables, showed statistically significant differences ($P<0.05$) between cases and controls in the univariate analysis (Table 2) regarding exposure to unbalanced diet, abuse of table scraps, overweight, dioestrus, glucocorticoids and spaying. According to the parameter estimates of the models, glucocorticoids and spaying were considered protective factors, while all other significantly different variables were considered risk factors. The “glucocorticoid” and “pancreatitis” variables have shown high correlation, but the “glucocorticoid” variable was not included in the multivariate analysis based on the low biological plausibility for glucocorticoid exposure to be a protective factor against CDM. Actually, this result is probably due to the hospital population consulted as controls. Moreover, once “spaying” is not assessed in the same model that includes the “irregular oestrous cycle” and “dioestrus” variables, it was not included in the multivariate ModF model.

Multivariate Models

Table 3 shows the OR and 95%CI final results after multivariate analysis for the ModMF and ModF models.

DISCUSSION

The main finding of this study is that after the analysis of different breeds, sexes, ages, and certainly different subtypes of diabetes, cases were more exposed to risk factors such as unbalanced diet and overweight than the matched nondiabetic controls, even in

the presence of the several risk factors investigated in the multivariate regression model. On the other hand, when the multivariate model was applied to females, the fact that diabetic females were more exposed to dioestrus at diagnosis came as no surprise as progesterone-related diabetes mellitus is a common type of CDM in our setting. Nonetheless, in this ModF model, the higher exposure of cases to abuse of treats, overweight, and unbalanced diet is in line with the results obtained by Wejdmark and others (2011).

The exclusion of cases with hyperadrenocorticism, as well as the matching of controls by breed, sex and age, albeit time-consuming, allowed eliminating possible biases associated with these factors, given that breed, advanced age, female sex and hyperadrenocorticism have already been described as risk factors for CDM (Peterson and others 1984, Guptill and others 2003, Fall and others 2007, Fukuta and others 2012). The breeds most frequently identified in this study are the most popular in our region and also the most prone to the development of diabetes, especially Poodles, even though the prevalence rates of canine diabetes in different regions is affected by fads and local preferences (Hess and others 2000, Hoenig 2002; Guptill and others 2003, Fracassi and others 2004, Catchpole and others 2005, Fall and others 2007). Misclassification bias probably was not present in our study once diabetes is easy to recognise.

For both models, after the multivariate analysis, unbalanced diet was consistently more frequent – at least four times higher in the life history of cases than of controls. Feeding the dog a commercially available diet + homemade food, or exclusively unbalanced homemade food, is often associated with a high-calorie diet associated with high carbohydrate and high fat content (Bland and Guthrie-Jones 2009), predisposing to obesity (German 2006). Exposure to this type of diet was associated

with lower glucose tolerance secondary to reduction in the beta-pancreatic cell activity (Kaiyala and others 1999), being also associated with larger appetite due to the lower insulin transport to the central nervous system (Kaiyala and others 2000), which highlights unbalanced diet as a risk factor for obesity and diabetes. Moreover, overfeeding and overweight have been attributed to activation of molecular pathways associated with insulin resistance in type 2 diabetes (Saltiel & Kahn 2001, Ozcan and others 2004,). The Kappa score for this variable in the questionnaire was 0.86 (sensitivity of 90.6%, $P < 0.001$) among cases (data not shown), which was considered very good, thus minimising the recall bias.

The abuse of veterinary or human treats (table scraps) are predisposing factors for weight gain (German 2006, Sallander and others 2010, Bland and Guthrie-Jones 2009; German and others 2011, Heuberger and Wakshlag 2011), being also implicated as risk factors for the development of diabetes (Klinkenberg and others 2006). However, when we conducted a matrix correlation analysis among those variables, there was no high correlation, and thus we assumed them as independent variables. Interestingly enough, only the frequency at which treats were given to the animals was accounted for, but not their amount and, therefore, those animals fed treats on a daily basis or more than once daily were considered to be exposed. This factor was statistically significant in the ModF, but not in the ModMF, model, after the multivariate analysis. This may have occurred due to the inclusion of oestrous cycle variables.

Anyway, the fact that diabetic bitches were three times more exposed to the abuse of human treats than female controls is in consonance with exposure to an unbalanced diet and predisposition to obesity (Heuberer and Wakshlag 2010). The Kappa score for this variable in the questionnaire was 0.91 (sensitivity of 91.5%, $P < 0.001$) among cases, which was considered excellent, despite the fact that owners of diabetic dogs

may try to downplay their possible role in disease development, understating the amount of treats given, or conversely, trying to explain the development of their dog's disease (Wejdmark and others 2011). This bias was clear when we evaluated BCS, probably due to the recall and confounding biases. Diabetic status causes emaciation and many patients at diagnosis no longer present with overweight (Feldman and Nelson 2004). In addition, dog owners have difficulty assessing the body condition of their pets, especially when they are overweight (Heuberger and Wakshlag 2011, White and others 2011). The Kappa score for this variable in the questionnaire was 0.57 (sensitivity of 73.9%, $P < 0.001$) among cases, which was considered reasonable.

Canine obesity is associated with different factors such as genetics, reproductive management and nutritional and physical management through the positive balance between calorie intake and energy expenditure (German 2006, Bland and Guthrie-Jones 2009). The association between high body condition scores (overweight/obesity) in adult life and the development of diabetes has been documented in dogs for over 50 years (Krook and others 1960, Pöppl and González 2005, Klinkenberg and others 2006, Wejdmark and others 2011). Nevertheless, although it is an important factor involved in the pathogenesis of type II diabetes in humans and in felines, no study has demonstrated how obesity can cause diabetes in dogs (Rand and others 2004). Actually, type II diabetes seems more "lipocentric" than "glucocentric" (McGarry 2002).

Studies have shown over the years that obese dogs have insulin resistance associated with a lower beta cell response, leading to lower glucose tolerance (Mattheeuws and others 1984; Rand and others 2004; German and others 2009). Besides, the higher secretion of inflammatory adipokines by adipocytes in response to overweight, justify insulin resistance in obesity (Saltiel and Kahn 2001, German and others 2009, Kil and

Swanson 2010). However, reduced concentrations of adiponectin are not seen in overweight dogs, and this may help prevent beta cell loss. Moreover, increased leptin levels in obese dogs help beta cells compensate for insulin resistance (Verkest and others 2011a, 2011b). If the beta cells of dogs exposed to insulin resistance do not improve their insulin secretion ability properly, hyperglycaemia may develop (Wejdmark and others 2011, Mared and others 2012). Dogs exposed to chronic hyperglycaemia can have beta cell depletion (glucotoxicity) and develop IDD (Imamura and others 1988), similarly to what is observed in the transition from non-insulin dependent diabetes to insulin-dependent diabetes in humans. However, when a dog becomes clinically diabetic, it is completely dependent on exogenous insulin to survive (Feldman and Nelson 2004), and there is no difference between obese and lean dogs concerning basal glucose levels (Faria and others 2005; Verkest and others 2012). Nevertheless, the latter authors conclude that canine beta cells are either not sensitive to toxicity because of mild hyperglycaemia, or lack another component of the pathophysiology of beta cell failure in type II diabetes because fasting insulin sensitivity was five times lower in obese dogs than in lean ones, whereas fasting beta cell function was 2.5 greater in obese animals than in lean ones.

The higher incidence of diabetes in females only occurs where elective spaying is not a common practice (Catchpole and others 2005) due to the eminent production of growth hormone (GH) by the mammary gland in response to endogenous or exogenous progestogens (Eigenmann and others 1983, Selman and others 1994). In addition to the influence of progesterone on the binding of insulin to its receptor, and to the reduced phosphorylation of the insulin receptor in response to progesterone (Ryan and Enns 1988; Pöppl and others 2012b), GH causes insulin resistance through

multiple mechanisms in the crosstalk between the intracellular communication pathways of GH and of insulin signalling (Dominici and others 2005).

The high odds ratio found for dioestrus in the ModF model is in line with previous studies which demonstrated insulin resistance during dioestrus (Eigenmann and others 1983, Selman and others 1994, Scaramal and others 1997, Fukuta and others 2012, Mared and others 2012) or higher incidence of diabetes during this phase of the oestrous cycle (Pöppl and González 2005, Fall and others 2010). The Kappa score for this variable in the questionnaire was 0.38 (sensitivity of 44%, $P = 0.001$) among cases, which was considered reasonable, due to unanswered questions (10) and those in which no agreement was achieved, demonstrating recall and information biases once this is an aspect hardly recognised and not properly recorded by owners, especially when applied to prevalent cases.

Despite the fact that many forms of diabetes are probably represented in this study with several breeds, the risk factors associated with CDM were similar to those reported by other authors (Klinkenberk and others 2006, Wejdmark and others 2011), and it is possible that this environmental influences are present worldwide, helping explain the greater incidence of CDM over the past decades (Guptill and others 2003). Based on this and on extant evidence, we strongly believe that feeding dogs balanced commercial dog food, keeping an ideal BCS, avoiding the abuse of treats, and spaying may be protective factors against CDM development.

References

Bland, I. M., Guthrie-Jones, A. & Hill T.J. (2009) Dog obesity: owner attitudes and behavior. *Preventive Veterinary Medicine* 92, 333-340

Catchpole, B., Ristic, J. M., Fleeman, L. M. & Davison, L. J. (2005) Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? *Diabetologia* 48, 1948-1956

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 Horm & IGF Research* 15, 324-336

Eingenmann, J. E., Eingenmann, R. Y., Rijinberk, A., Gaag, I., Zapf, J. & Froesch, E.R. (1983) Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. *Acta Endocrinologica* 104, 167-176

Fall, T., Hamlin, H. H., Hedhammar, A., Kämpe, O. & Egenwall, A. (2007) Diabetes mellitus in a population of 180,000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 1209-1216

Fall, T., Hedhammar, A., Wallberg, A., Fall, N., Ahlgren, K.M., Hamlin, H.H., Lindblad-Toh, K., Andersson, G. & Kämpe, O. (2010) Diabetes Mellitus in Elkhounds is associated with diestrus and pregnancy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 322-1328

Farias, P. F., Araújo, D. F. & Soto-Blanco, B. 2005. Glicemia em cães obesos e senis. *Acta Scientiae Veterinariae* 33, 47-50

Feldman, E. C. & Nelson, R. W. (2004) Canine diabetes mellitus. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3rd edn. Eds. E. C. Feldman and R. W. Nelson. Saunders, Missouri, 1089 pp

Fracassi, F., Pietra, M., Boari, A., Aste, G., Giunti, M. & Famigli-Bergamini, P. (2004) Breed distribution of canine diabetes mellitus in Italy. *Veterinary Research Communications* 28, 339-342

Fukuta, H., Mori, A., Urumuhan, N., Lee, P., Oda, H., Saeki, K., Kurushima, M., Nozawa, S., Mizutani, H., Mishina, S., Arai, T. & Sako, T. (2012). Characterization of

insulin resistance induced by Cushing syndrome or diestrus against healthy control dogs as determined by euglycemic-hyperinsulinemic glucose clamp profile glucose infusion rate using an artificial pancreas apparatus. *The Journal of Veterinary Medical Science* Jul 6, in press

German, A. J. (2006) The growing problem of obesity in dogs and cats. *Journal of Nutrition* 136, 140-146

German, A. J., Hervera, M., Hunter, L., Holden, S. L., Morris, P. J., Biourge, V. & Trayhurn, P. (2009) Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. *Domestic Animal Endocrinology* 37, 214-226

German, A. J., Holden S. L., Gernon L. J., Morris P. J. & Biourge V. (2011) Do feeding practices of obese dogs, before weight loss, affect the success of weight management? *British Journal of Nutrition* 106, S97-S100

Guptill, L., Glickman, L. & Glickman, N. (2003) Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records. *The Veterinary Journal* 165, 240-247

Hess, R. B., Kass, P. H. & Ward, C. R. (2000) Breed distribution of dogs with diabetes mellitus admitted to a tertiary care facility. *Journal of American Veterinary Medical Association* 216, 1414-1417

Heuberger, R. & Wakshlag J. (2011) The relationship of feeding patterns and obesity in dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95, 98-105

Hoenig, M. (2002) Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197, 221-229

Imamura, T., Koffler, M., Helderman, J. H., Prince, D., Thirlby, R., Inman, L. & Unger, R. H. (1988) Severe diabetes induced in subtotally depancreatized dogs by sustained hyperglycemia. *Diabetes* 37, 600-609

Kaiyala, K. J., Prigeon, R. L., Kahn, S. E., Woods, S. C., Porte, T. & Schwartez, M. W. (1999) Reduced β-cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese with a high-fat feeding. *American Journal of Physiology* 277, E659-E667

Kaiyala, K. J., Prigeon, R. L., Kahn, S. E., Woods, S. C. & Schwartez, M. V. (2000) Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes* 49, 1525-1533

Kil, D. Y. & Swanson, K. S. (2010) Endocrinology of obesity. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 40, 205-219

Klinkenberg, H., Sallander, M. H. & Hedhammar, A. (2006) Feeding, exercise and weight identified as risk factors in canine diabetes mellitus. *Journal of Nutrition* 136, 1985-1987

Krook, L., Larsson, S. & Rooney, J. R. (1960) The interrelationship of diabetes mellitus, obesity and pyometra in the dog. *American Journal of Veterinary Research* 21, 120-127

Mared, M., Catchpole, B., Kämpe, O. & Fall, T. (2012) Evaluation of circulating concentrations of glucose homeostasis biomarkers, progesterone, and growth hormone in healthy Elkhounds during anestrus and diestrus. *American Journal of Veterinary Research* 73, 242-247

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

McGarry, J. D. (2002) Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 7-18

Ozcan, U., Cao, Q., Ylmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H. & Hotamisligil, G. S. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461

Peterson, M. E., Altszuler, N. & Nichols, C. E. (1984) Decreased insulin sensitivity and glucose tolerance in spontaneous canine hyperadrenocorticism. *Research in Veterinary Science* 36, 177-182

Pöppl, A.G. & González, F.H.D. (2005) Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. *Acta Scientiae Veterinariae* 33, 33-40

Pöppl, A. G., Meyrer, B., Carvalho, G. L. G., Corbellini, L. G. & González, F. H. D. (2012) Risk factor assay accuracy in canine diabetes mellitus development, and survival after diagnosis. Proceedings of the 2° International Congress from the Brazilian Association of Veterinary Endocrinology. November 15 to 17, Búzios, Brazil. pp 34-35.

Pöppl, A. G., Valle, S. C., González, F. H. D., Beck, C. A. C., Kucharski, L. C. & Da Silva, R. S. M. (2012) Estrus cycle effect on muscle tyrosine kinase activity in bitches. *Veterinary Research Communications* 36: 81-84

Rand, J. S., Fleeman, L. M., Farrow, H. A., Appleton, D. J. & Lederer, R. (2004) Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture? *Journal of Nutrition* 134, 2072-2080

Ryan, E. A. & Enns, L. (1988) Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67, 341-347

Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806

Sallander, M. H., Hagberg, M., Hedhammar, A., Rundgren, M. & Lindberg, J. E. (2001) Energy-intake and activity risk factors for owner-perceived obesity in a defined population of Swedish dogs. *Preventive Veterinary Medicine* 96, 132-141

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, 169-180

Selman, P. J., Mol, J. A., Rutteman, G. R. & Rijnberk, A. (1994) Progestin treatment in the dog I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *European Journal of Endocrinology* 131, 413-421

Verkest, K. R., Fleeman, L. M., Morton, J. M., Ishioka, K. & Rand, J. S. (2011) Compensation for obesity induced insulin resistance in dogs: assessment of the effects of leptin, adiponectin and glucagon-like peptide-1 using path analysis. *Domestic Animal Endocrinology* 41, 24-34

Verkest, K. R., Rand, J. S., Fleeman, L. M., Morton, J. M., Richards, A. A., Rose F. J. & Whitehead, J. P. (2011) Distinct adiponectin profiles might contribute to differences in susceptibility to type 2 diabetes in dogs and humans. *Domestic Animal Endocrinology* 41, 67-73

Verkest, K. R., Rand, J. S., Fleeman, L. M. & Morton, J. M. (2012) Spontaneously obese dogs exhibit greater postprandial glucose, triglyceride, and insulin concentration than lean dogs. *Domestic Animal Endocrinology* 42, 103-112

Wejdmark, A. K., Bonnet, B., Hedhammar, A. & Fall, T. (2011) Lifestyle risk factors for progesterone-related diabetes mellitus in Elkhounds – a case-control study. *Journal of Small Animal Practice* 52, 240-245

White, G. A., Hobson-West, P., Cobb, K., Graigon, J., Hammond, R. & Millar, K. M. (2011) Canine Obesity: is there a difference between veterinarian and owner perception? *Journal of Small Animal Practice* 52, 622-626

Table 1. Results of univariate conditional logistical regression analysis in 110 dogs and 136 controls matched by breed, age and sex.

Variable studied	Cases n (%)	Controls n (%)	OR	P-value
Unbalanced diet	78 (71.0)	40 (29.4)	5.3	<0.01
Excessive meals	44 (40.0)	33 (24.3)	1.78	0.09
Abuse vet treats	47 (43.0)	34 (25)	2.12	0.04
Abuse table scraps	58 (53.0)	36 (26.5)	4.61	<0.01
Inactivity	42 (38.0)	57 (41.9)	0.73	0.36
Walks outside	65 (59.0)	74 (54.4)	1.38	0.33
Intense physical activity	34 (31.0)	62 (45.6)	0.73	0.35
Overweight	84 (76.0)	48 (35.3)	3.97	<0.01
Dental calculus	23 (21.0)	24 (17.6)	1.79	0.2
Halitosis	21 (19.0)	14 (10.3)	1.84	0.27
Toothbrushing	14 (13.0)	36 (26.5)	0.5	0.12
Dental prophylaxis	33 (30.0)	41 (30.1)	0.94	0.87
Pancreatitis	20 (18.0)	6 (4.4)	2.68	0.11
Glucocorticoids	8 (7.0)	18 (13.2)	0.42	0.18
Castration	44 (40.0)	70 (51.5)	0.54	0.06

Table 2. Results of univariate conditional logistical regression analysis in 81 female diabetic bitches and 104 controls matched by breed, age and sex.

Variable studied	Cases n (%)	Controls n (%)	OR	P-value
Unbalanced diet	55 (67.9)	34 (32.7)	5.04	<0.01
Excessive meals	32 (39.5)	25 (24)	1.6	0.2
Abuse vet treats	31 (38.3)	27 (26)	1.99	0.08
Abuse table scraps	40 (49.3)	27 (26)	4.84	<0.01
Inactivity	30 (37)	45 (43.3)	0.54	0.11
Walks outside	46 (56.8)	51 (49)	1.6	0.18
Intense physical activity	30 (37)	49 (47.1)	0.77	0.46
Overweight	64 (79)	43 (41.3)	4.01	<0.01
Dental calculus	13 (16)	13 (12.5)	1.29	0.6
Halitosis	12 (14.8)	9 (8.6)	1.73	0.39
Toothbrushing	10 (12.3)	23 (22.1)	0.52	0.2
Dental prophylaxis	22 (27.2)	25 (24)	0.94	0.88
Pancreatitis	10 (12.3)	5 (4.8)	2.83	0.16
Glucocorticoids	3 (3.7)	16 (15.4)	0.26	0.03
Castration	31 (38.3)	62 (59.6)	0.33	<0.01
Progestogen	6 (7.4)	8 (7.7)	0.93	0.92
Irregular estrus cycle	10 (12.3)	7 (6.7)	2.18	0.26
Dioestrus	34 (66)	12 (28.6)	4.33	<0.01

Table 3. Final results of multivariate conditional logistical regression analysis for both unisex model (ModMF) and female model (ModF) expressed in odds ratio (OR) with 95% confidence interval (95% CI).

	OR	**95% IC**	**P-value**
ModMF			
Unbalanced diet	4.86	2.2 – 10.7	<0.01
Overweight	3.51	1.6 – 7.5	<0.01
ModF variable			
Unbalanced diet	4.14	1.3 – 12.7	0.01
Abuse table scraps	3.62	1.1 – 12.2	0.03
Overweight	3.91	1.2 – 12.6	0.02
Dioestrus	5.53	1.9 – 16.3	<0.01

4.5 Manuscrito 5

Insulin resistance due to periodontal disease in an old diabetic female poodle

Álan Gomes Pöppl[1], Fernanda Müller[2], Luciana Queiroga[3], Félix Hilário Díaz González[4]

[1] DVM., MSc., Endocrinologist, PhD Student at the School of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Amapá, 1319, Vila Nova, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 91740-460. Email: gomespoppl@hotmail.com. Tel: +55 51 96684995. Fax: +55 51 33086112

[2] DVM., Esp., Dentist. Rua Germano Petersen Junior, 627/401, Auxiliadora, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 90540-140. Email: nandamuller33@hotmail.com. Tel: +55 51 81723333.

[3] DVM., MSc., Anesthesiologist. Rua16 de Julho, 30/2, São João, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 90550-020. Email: luvetufrgs@yahoo.com.br. Tel: +55 51 30120674.

[4] DVM., MSc. PhD. Associate Professor, Department of Animal Clinical Pathology, School of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 91540-000. Email: felixgonzales.ufrgs@gmail.com. Tel: +55 51 33088033. Fax: +55 51 33086112

Summary:

The purpose of this work was to report a clinical case of a spayed, 13-year-old diabetic poodle on insulin therapy with insulin resistance and poor diabetes control secondary to severe periodontitis. Prior to establishing the periodontal surgical approach, the insulin dose needed to be increased to stabilize the patient. Periodontal treatment included the extraction of 19 teeth. After periodontitis treatment, the insulin dose could be reduced to the previous effective dose. To our knowledge, this is the first case report of insulin resistance due to periodontal disease in dogs.

Introduction

Periodontitis is the most common pathological condition in dogs;[1] in addition, the interplay between diabetes and periodontitis has been widely recognized as a two-way process in human patients, once diabetic state predisposes to periodontal disease by means of different mechanisms, and periodontal disease may trigger insulin resistance.[2] However, there is a paucity of studies correlating diabetes and periodontal disease in dogs. The purpose of this work is to report one case of a diabetic female poodle on insulin therapy for more than one year with insulin resistance secondary to severe periodontitis.

Case Report

A spayed, 13-year-old dog weighing 6 kg was under adequate glycemic control by use of a commercially available high-fiber diet[b] and human NPH insulin[c] (3U) twice daily. Its latest fructosamine and albumin concentrations were 318 µmol/L and 3.15 g/L, respectively. Although the owner was advised to look for a veterinary dental service to

[a] Weight Control, Royal Canin, SP, Brazil
[c] Humulin N, Eli Lilly and Company, SP, Brazil

treat his dog's prominent calculus formation, gingivitis and halitosis, he refused to do so because of the risk of a general anesthesia. The owner monitored glycosuria at home every single day by the use of reagent strips[d], and traces of glucose, or negative results, were always found. Suddenly, four months after the last follow-up visit to the endocrinologist, the owner reported an increase in glycosuria to +++ / ++++. The development of polyuria and polydipsia on the past days was another worry. The owner also reported that there was no change in the patient's routine. The animal showed severe halitosis and was in distress at the manipulation of the oral cavity. The oral examination revealed severe periodontal reaction with severe gingival hyperemia and edema, with gingival retraction in the region of upper right and left canines, premolars and molars, calculus accumulation grade II to III between the canines, premolars and molars of both upper dental arches, purulent exudate, with obvious gingival recession, as well as grade II mobility in teeth 105, 106, 108, 109,110 201, 202, 205, 206, 207, 208, 302, 303, 305, 306, 309, 310, 405 and 410 and loss of teeth 107, 307 and 308, characterizing active periodontal disease (Fig 1).

A blood workup was done and the main findings were marked neutrophilia (15,975/mm3) with activated monocytes, glycemia of 419 mg/dL after two hours and of 326 mg/dL after 10 hours of insulin application, as well as a fructosamine concentration of 379 µmol/L, and serum ALT of 403 U/L. Other parameters were within the reference range (ALP, creatinine, albumin). Table 1 shows the patient's hematological and biochemical parameters three months before loss of diabetes control, at the time when active periodontal disease was diagnosed and three weeks, and six months after periodontal treatment. The abdominal ultrasound showed no abnormalities regarding urinary tract and size of adrenal glands. Notwithstanding, a

[d] Diastix, Bayer, IN, USA

urinary culture and a low-dose dexamethasone suppression test were performed, indicating absence of bacterial growth after 72h of incubation and a serum cortisol level of 0.32 µg/dL 8h after the intravenous administration of 0.01 mg/kg of dexamethasone[e] (normal < 1.0 µg/dL, consistent with Cushing's disease > 1.4 µg/dL). The insulin dose was then increased to 4U twice daily and a diagnosis of active periodontal disease was made.

Immediate treatment was initiated with metronidazole and spiramycin[f] at the dose of 75,000 IU/kg of spiramycin and 25 mg/kg of metronidazole once daily for 14 days, in addition to oral hygiene with chlorhexidine 0.12%[g] once daily, applied every day with a gauze for an indefinite time period. Based on the specific clinical signs of the oral cavity, the periodontal treatment consisted of extraction of the affected teeth.

After three days on routine antibiotic therapy, the patient was submitted to oral prophylaxis in the morning, with observation of fasting after that. Before taking the patient to the clinic, the owner was told to give her dog half of the insulin dose (2U), without feeding her.

Midazolam[h] at the dose of 3mg/kg and methadone hydrochloride[i] at the dose of 0.2 mg/kg, were given intramuscularly as preanesthetic medications Anesthetic induction was performed by intravenous administration of propofol[j] at the dose of 5mg/kg, whereas anesthetic maintenance was obtained by isoflurane[k], applied by a universal vaporizer. Throughout the procedure, the patient received lactated Ringer's solution[l] at

---

[e] Azium, Schering-Plough, SP, Brazil
[f] Stomorgyl, Pfizer, Tolouse, França
[g] Periogard, Colgate-Palmolive Company, Brazil
[h] Midazolam, Hipolabor, BH, Brazil
[i] Mytedom, Cristália, SP, Brazil
[j] Propovan, Cristália SP, Brazil
[k] Isoflurano, Biochimico, RJ, Brazil
[l] Ringer Lactato, Equiplex, GO, Brazil

the dose of 10ml/kg/h. Lidocaine hydrochloride[m] (2 mg/kg) was used for local block of the right and left infraorbital nerves and right and left mandibular nerves. Before and during the procedure and in the immediate post-anesthetic period, glucose was checked every 20-30 minutes using a portable glucose meter[n]. To maintain glucose levels between 150 and 250 mg/dL, a bolus dose of glucose 25%[o] was given whenever necessary.

The animal was placed in lateral decubitus and the surgical procedure began with the hygiene of the oral cavity using a gauze soaked in chlorhexidine 0.12%[f], rubbing it on the vestibular face of all teeth of the left half of the upper and lower arch. With a graded probe, all the teeth of the upper and lower half of the arch were examined. The probe went deep into the gingival groove of all teeth on all faces (Fig. 2), except for the canines. With a forceps, the coarsest dental calculus was removed, and it was possible to observe the exposure of furcation grade III in teeth 106,109,110, 206, 207, 208, 306, 309 and 310 (Fig 3).

Owing to the mobility of these teeth, we decided to pull them out using an extraction technique for single-rooted teeth. By placing a periosteal elevator between the tooth and the alveolar crest, delicate rotation movements were performed for 10 seconds in order to break off the remaining fibers of the periodontal ligament of the root of each tooth and, after that, using a forceps, the teeth were pulled out from their sockets. Each socket was curetted and irrigated with sterile saline[p]. Teeth 108, 208 and 309 were extracted according to the multirooted tooth extraction technique. Due to the exposure of the furcation of these teeth and to mobility, they had to be broken into chunks with

[m] Xylestesin, Cristália, SP, Brazil
[n] Accucheck Active, Roche, SP, Brazil
[o] Glicose 50%, Geyer, RS, Brazil
[p] NaCl 0.9%, Equiplex, GO, Brazil

an inverted cone bur[q] attached to the high-speed handpiece[r]. The bur was drilled into the furcation and then crown-wise, turning multirooted teeth into single-rooted ones. Thereafter, the periosteal elevator was inserted between the tooth and the dental crest and, with delicate rotation movements for 10 seconds, the remaining periodontal ligament underwent luxation, and the roots were pulled out from the sockets using a forceps. The sockets were curetted and irrigated with sterile saline. The gingival mucosa of all extracted teeth was sutured with a polyglactin 910[s] absorbable mesh of size 4-0, using a simple interrupted pattern.

The remaining teeth of the right upper and lower half of the arch were extracted by the same afore-mentioned methods, totaling 19 teeth (Fig 4). A dental ultrasound[t] was used in canines and teeth, 104, 204, 304 and 404 for removal of superficial dental calculi. The same was done for teeth 103, 101, 102, 203, 301, 401, 402, 403, 406, 407, 408 and 409. Probing of these teeth revealed no abnormalities. The remaining teeth were polished with a rubber cup[u] attached to the straight low-speed handpiece[v], using pumice stone[w] and fluorine[x] as prophylactic agent.

In the immediate post-anesthesia period, the patient received meloxicam[y], 0.1 mg/kg, IV. In the same evening, the patient was back to its regular insulin scheme and eating habits; however, the commercial dry food was replaced with diabetic canned dog food[z] temporarily during the first postoperative days.

---

[q] Carbide FG 57L, Mailbefes Instruments, Swiss
[r] Silent MRS 400 FG, Dabi Atlante, SP, Brazil
[s] Vicryl, Ethicom, SP, Brazil
[t] Sonicborden 2000N, Kavo, SC, Brazil
[u] Microdont, Microdont Micro, SP, Brazil
[v] Contra Ângulo e Micromotor, Dabi Atlante, SP, Brazil
[w] Pedra Pomes em Pó, QUimidrol, SC, Brazil
[x] Flugel, DFL, RJ, Brazil
[y] Maxicam, OuroFino, SP, Brazil
[z] Diabetes Special, Royal Canin, France

Ten days after surgery, while maintaining antibiotic therapy and daily 0.2% chlorhexidine cleaning, the owner reported a hypoglycemic episode with muscular jerks. The insulin dose was reduced to 3U and the dog achieved normoglycemia, as detected by the traces of glucose in the urine reported every day since then, as well as by the biochemical tests (Table 1). There were no healing problems at this visit (Fig 5) and after six months, an extraoral laterolateral radiograph indicated that the remaining teeth were intact, except for the lower right first molar, which showed periapical bone lysis around the mesial root and bone loss on the palatine and vestibular faces in the furcation (Fig 6).

Discussion

Although it is a common issue in endocrinological and dental services in human medicine,[2-6] little is known about the interactions of oral diseases such as periodontitis with insulin resistance and diabetes mellitus in pets. One case of diabetes mellitus deregulation secondary to multiple dental infections has been recorded,[7] and periodontal disease has been implicated as a risk factor for diabetes development in Australian cats.[8] On the other hand, it was demonstrated decades ago that inflammatory reactions, as well as leukocyte migration, are reduced in diabetic dogs during bacterial plaque formation.[9] This is in agreement with observations in the medical and dental literature that characterize periodontitis and diabetes as a two-sided coin.[2,3]

Many diabetic pets suffer from some degree of periodontal disease, one of the most regular pathological conditions in veterinary practice.[1] The majority of evidence demonstrates an increase in the prevalence and severity of periodontal disease in people with diabetes mellitus.[3,5] Several studies in humans show that the risk and rate

of gingivitis, periodontitis and alveolar bone loss progression are two to four-fold higher in diabetic patients, even after adjusting for confounding variables such as age, sex and oral hygiene measures.[2] However, it seems that there is a dose-response relationship between periodontal disease risk and glycemic control, so patients with well-controlled diabetes may not be at an increased risk for developing periodontal diseases,[6] as well as it is likely that there is individual patient variability in the degree to which glycemic control influences periodontal status,[2] related not only to different levels of metabolic control, but also to different gene pools that appear to have a strong relationship with rapid periodontal breakdown.[3,5,6]

Although periodontal diseases are infectious pathologies, occasional differences in microbial flora among patients with and without diabetes were shown to be of minor importance,[2] even with the higher concentrations of glucose, calcium and urea in the saliva and crevicular fluid of patients with diabetes, which create a unique environment with possibility of shifts in the bacterial flora.[6] Instead, the host-response abnormalities observed in diabetic patients seem to be the major difference.[2] For example, the adherence, chemotaxis and fagocytosis functions of neutrophils, monocytes and macrophages are often impaired in people with diabetes, and the inhibition of their function may reduce bacterial destruction in the periodontal pocket.[6] This reduced polymorphonuclear function observed in diabetes is also well recognized in veterinary practice[10] and may have had some involvement in the progression of periodontal disease in this case.

However, these cells can also exhibit an upregulated immunoinflammatory response to periodontal pathogens, with elevated production of proinflammatory cytokines such as interleukin 1β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF- α), which may increase host

tissue destruction.[2] This upregulated response is mediated by interactions between advanced glycation end products (AGEs) and their receptors in inflammatory cells.[6] The accumulation of AGEs in diabetic patients is associated with many chronic complications of diabetes and can cause endothelial dysfunction, capillary growth and vessel proliferation in periodontal tissues of diabetic people.[2] Notwithstanding, this higher production of proinflammatory cytokines have also been correlated with imbalances in lipid metabolism that are common features of diabetic state, such as hypertriglyceridemia and high levels of free fatty acids and LDL cholesterol.[11,12] Fructosamine concentration, is a measure of glycated proteins in the plasma, especially albumin, and thus reflects how glycemia behaved during the past 2-3 weeks.[13] The elevation of fructosamine concentration in this patient, associated with periodontal disease progression, does not only point out an insulin resistance status, but is also in agreement with observations of positive correlation between serum fructosamine, degree of gingival bleeding and severity of gingival inflammation observed in human diabetic subjects.[14,15]

Furthermore, there is an elevated production of matrix metalloproteinases (MMP) in people with diabetes, and these MMP can quickly degrade the collagen produced by the fibroblasts during wound healing, impairing periodontal wound healing in patients with persistent hyperglycemia. Moreover, fibroblasts do not function properly in high-glucose environments.[2] In addition, degenerative vascular changes observed in other tissues in diabetic people also occur in gingival tissues, reducing both the capacity of delivery of nutrients, the leukocyte access and the elimination of metabolic products, thus worsening wound healing in long-term diabetic patients.[6]

Regarding collagen metabolism, evidence shows that the diabetic state can increase the degradation of any newly synthesized collagen in various connective tissues throughout the body, including gingival tissue, where high levels of AGEs can induce glycosylation of the existing collagen at wound margins and consequent delayed remodeling due to excessive oxidative stress as a potential mechanism.[6,16]

Notwithstanding, evidence shows that periodontal diseases can contribute to poorer glycemic control in people with diabetes due to higher IL-1 and TNF-α levels in crevicular fluids and serum of people with periodontitis. Once periodontal disease has a major chronic inflammatory component, plasma elevation of those cytokines can generate insulin resistance and make it difficult for diabetic patients to control their glycemic level,[17,18] exactly as we documented in this case. The mechanisms whereby these main proinflammatory interleukins (IL-1, TNF-α) released in the serum of patients with periodontal diseases cause insulin resistance are diverse. Basically, those cytokines impair intracellular signaling of insulin in target cells such as adipose and muscle tissue, inducing a lower expression of IRS-1 (insulin receptor substrate - 1, the most important second messenger of insulin receptor) and also inducing phosphorylation in serine residues of the IRS-1 instead of phosphorylation in tyrosine residues.[19,20]

In fact, we investigated any other cause of insulin resistance in this case, especially occult urinary tract infections and hyperadrenocorticism, two conditions that are often diagnosed in old diabetic female poodles.[10, 21] However, negative urine culture and low dexamethasone dose suppression test together with ultrasound evaluation of urinary tract and adrenal gland morphology rule out these diseases. Occasional mistakes in insulin storage, handling or dosage were also taken into account, but the

owner has a large experience with the treatment and no failures were identified.[10] Based on the latest blood work and clinical history,[10, 22,23] the dog was under perfect diabetes control by means of two injections of NPH insulin (0.5U/kg), associated with two meals of an adequate commercial food every 12 hours, before the development of polyuria, polydipsia and increased glycosuria, indicating that there was something wrong going on.[24] Meanwhile, CBC showed a marked inflammatory reaction with important neutrophilia and active monocytes, and after evaluation of the case, the only obvious inflammatory reaction was located in the mouth (Fig 1). Interestingly enough, bacterial infections are often associated with insulin resistance, but periodontitis, one of the most prevalent bacterial conditions in veterinary practice, does not show this correlation.[1, 10, 21,25]

Moreover, it has been shown that, in some cases, a minimal treatment of gingivitis and periodontitis in diabetic patients is sufficient to provide a better glycemic control in humans,[26] despite no agreement among all papers looking for this association, probably due to differences in methodology and clinical criteria adopted in different studies.[4] In the present report, we observed quick restoration of the previous insulin sensitivity status few days after resolution of the infectious condition, and generally, this better glycemic control secondary to periodontal treatment came along with the reduction in IL-1 and TNF-α levels.[2,4]

To treat this dog, a preoperative antibiotic therapy was proposed to prevent severe bacteremia and occasional systemic infections of periodontal origin during the surgical approach, as commented.[27-29] For the same reason, we decided to start the procedure with oral hygiene using chlorhexidine.[30] The anesthetic management with the use of potent tranquilizers and painkillers, as well as bilateral mandibular nerve blockage,

sought to reduce the release of hyperglycemic hormones secondary to anesthetic and surgical stress.[10] The administration of half of the insulin dose in the morning in which the surgery was performed, keeping the patient under fasting conditions, is in line with the protocol used in large centers for diabetes treatment and, in this case, glucose levels must be monitored regularly to prevent intraoperative hypoglycemia or hyperglycemia. The aim in these cases is to maintain glucose levels between 150-250 mg/dL, and to achieve that, continuous intravenous infusion of 2.5 to 5% glucose, or a bolus dose of 50%, or a regular dose of intramuscular insulin 0.1 mg/kg as needed[10] is given. In the present report, a regular dose of insulin was not necessary as NPH insulin, given as a half dose, maintained good glycemic control in the intraoperative period. With respect to the surgical technique used for the extraction of the most severely affected teeth, followed by curettage of the sockets and ultrasonographic maintenance and cleaning of the least affected teeth, the adopted procedures are in agreement with the classic recommendations for the treatment of periodontitis in dogs.[27,28] Intraoperative assessment and probing of periodontal pockets during the procedure unequivocally confirmed the diagnosis of severe periodontitis,[1] despite the absence of presurgical radiographs, which were not authorized by the dog owner. During the three-year follow-up of this case, the owner cleaned her dog's teeth with chlorhexidine 0.12% on a daily basis, being successful at maintaining adequate oral health, even though most pet owners eventually quit doing that some months after the prophylaxis.[31]

Although it is not certain whether oral intervention improves glycemic control, it seems to be a reasonable approach in people and pets with diabetes to conduct an aggressive management of oral health and a regular follow-up, given the potential link between periodontal disease and diabetes.[3] Many classical interactions between

periodontitis and diabetes could be observed in the present report; however, we cannot provide evidence that periodontal disease has progressed faster secondary to the diabetic state in this case. Nevertheless, it was clear that periodontitis was the cause of insulin resistance in the present case once many studies in humans and other models have pointed out that periodontal disease, as well as any chronic inflammatory process, can be considered strong risk factors for diabetes development and worse glycemic control of diabetic patients.[2-6] In addition, encouraging owners of diabetic dogs to maintain the adequate oral health of their pets by toothbrushing, chews, and a diet that is not exclusively wet (canned food), can help prevent the progression of gengivitis and periodontitis in many cases.[32,33]

Acknowledgments

The author would like to thank Dr. Cristiano Gomes DVM., MSc., and posthumously thank Prof. Dr. Breno Martins Futuro for their valuable incentive to study the relationships between veterinary endocrinology and dentistry.

References

1. Niemic BA. Periodontal disease. *Top Companion Anim Med 2008*; 23: 72-80.

2. Mealey BL. Periodontal disease and diabetes: a two-way street. *J Am Dent Assoc 2006*; 137: 26S-31S.

3. Skamagas M, Breen TL, et al. Update on diabetes mellitus prevention, treatment, and association with oral diseases. *Oral Dis 2008*; 14: 105-114.

4. Taylor GW. The effects of periodontal treatment on diabetes. *J Am Dent Assoc 2003*; 134: 41S-48S.

5. Ship JA. Diabetes and oral health. *J Am Dent Assoc 2003*; 134: 4S-10S.

6. Ryan ME, Carnu O, et al. The influence of diabetes on the periodontal tissues. *J Am Dent Assoc 2003*; 134: 34S-40S.

7. Van Nice E. Management of multiple dental infections in a dog with diabetes mellitus. *J Vet Dent 2006*; 23: 18-25.

8. Lederer R, Rand JS, et al. Chronic or recurring medical problems, dental disease, repeated corticosteroid treatment, and lower physical activity are associated with diabetes mellitus in Burmese cats. *J Vet Inter Med 2003*; 17: 433.

9. Matsson L, Attström R, et al. Inflammatory reactions in the gingival region during the development of bacterial plaque in alloxan-diabetic dogs. *J Period Res 1980*; 15: 516-524.

10. Feldman EC, Nelson RW. Canine diabetes mellitus. In: Feldman EC, Nelson RW, eds. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction 3rd*. Missouri: Saunders, 2004; 486-538.

11. Cutler CW, Shinedling EA, et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? *J Periodontol 1999*; 70: 1429-1434.

12. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol 2000*; 71: 1375-1380.

13. Loste A, Marca MC. Fructosamine and glycated hemoglobin in the assessment of glycaemic control in dogs. *Vet Res 2001*; 32: 55-62.

14. Unal T, Firatli E, et al. Fructosamine as a possible monitoring parameter in non-insulin dependent diabetes mellitus patients with periodontal disease. *J Periodontol 1993*; 64: 191-4.

15. Firatli E, Unal T, et al. Serum fructosamine correlates with gingival index in children with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *J Clin Periodontol 1994*; 21: 565-8.

16. Schmidt A, Weidman E, et al. Advanced glycation end products (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontal Res 1996*; 31: 508-515.

17. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol 2008*; 79: 1527-1534.

18. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol 2001*; 6: 125-137.

19. Grimble RF. Inflammatory status and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2002*; 5: 551-559.

20. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med 2008*; 14: 222-231.

21. Hess RS. Insulin resistance in dogs. *Vet Clin Small Anim 2010*; 40: 309-316.

22. Fleeman LM, Rand JS. Management of canine diabetes. *Vet Clin North Am Small Anim Pract 2001*; 31: 855-880.

23. Schulman RL. Insulin and other therapies. *Vet Med 2003*; Apr: 334-347.

24. Behrend EN. Diabetes mellitus: an update on oral hypoglycemic agents and monitoring options. *Vet Med 2002*; Oct: 743-751.

25. Hess RS, Saunders HM, Van Winkle TJ, Ward CR. Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993-1998). *J Am Vet Med Assoc 2000*; 217: 1166-1173.

26. Madden TE, Herriges B, Boyd L, Laughlin G, Chiodo GT, Rosenstein DI. Alterations in HbA1c following minimal or enhanced non-surgical, non-antibiotic treatment of gingivitis or mild periodontitis in type 2 diabetic patients: a pilot trial. *J Cont Dent Pract 2008*; 9: 1-13

27. Wigs RB, Lobprise HB. Periodontology. In: *Veterinary Dentistry, Principles and Practice*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1997; 186-231

28. Harvey CE, Emily PP. Periodontal Disease. In: *Small Animal Dentistry*. St. Louis: Mosby 1993; 89-144

29. Alexander R. Routine prophylactic antibiotic use in diabetic dental patients. *J Calif Dent Assoc 1999*; 27: 611-618.

30. Bowersock TL, Wu CC, Inskeep GA, Chester ST. Prevention of bacteremia in dogs undergoing dental scaling by prior administration of oral clindamycin or chlorhexidine oral rinse. *J Vet Dent 2000*; 17: 11-16.

31. Miller BR. Compliance with oral hygiene recommendations following periodontal treatment in client-owned dogs. *J Vet Dent 1994*; 11: 18-19.

32. Harvey CE, Shofer FS, Laster L. Correlation of diet, other chewing activities and periodontal disease in North American client-owned dogs. *J Vet Dent 1996*; 13: 101-105.

33. Rawlings JM, Vet CG, Markwell PJ. Effect on canine oral health of adding chlorhexidine to a dental hygiene chew. *J Vet Dent 1998*; 15: 129-138.

Figure 1. Patient's oral examination showing intense calculus, significant gingival inflammation, calculus accumulation, and purulent exudates with obvious gingival recession, indicating attachment loss due to periodontal disease.

Figure 2. Periodontal probing showing an evident deep periodontal pocket.

Figure 3. Furcation involvement grade III evidenced after calculus removal.

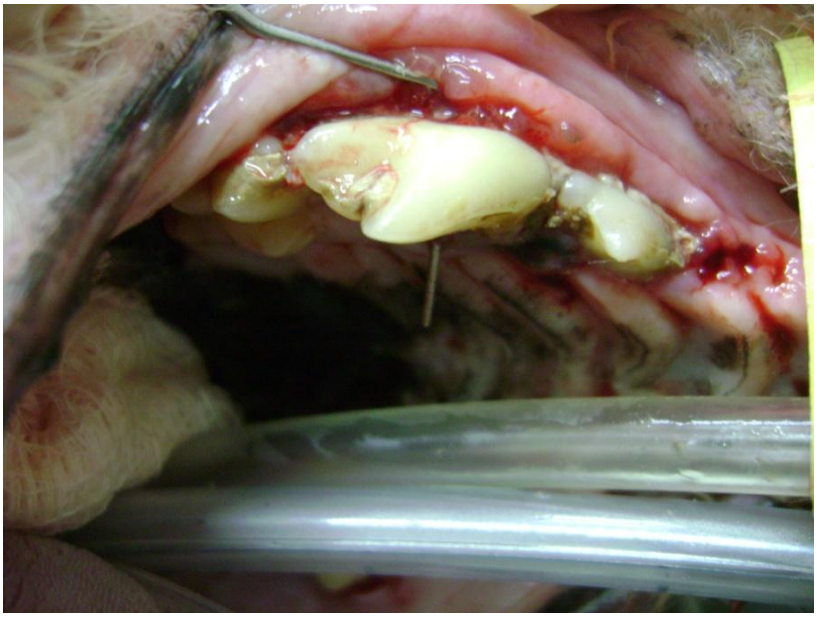


Figure 4. Nineteen harshly periodontally affected teeth extracted at the end of the oral prophylaxis aleatoric disposed and named accordingly Triadan classification. Upper line: teeth 208,108,309. Middle line: teeth 106, 207, 206, 110, 310, 306, 210. Lower line: teeth 202, 305, 303, 105, 410, 302, 301, 405, 205.

Figure 5. Adequate gingival healing after ten days of oral prophylaxis.

Figure 6. Control radiograph 6 months after the procedure showing signs of root resorption and furcal exposure in the lower third molar and possible bone resorption in the lower dental arches.

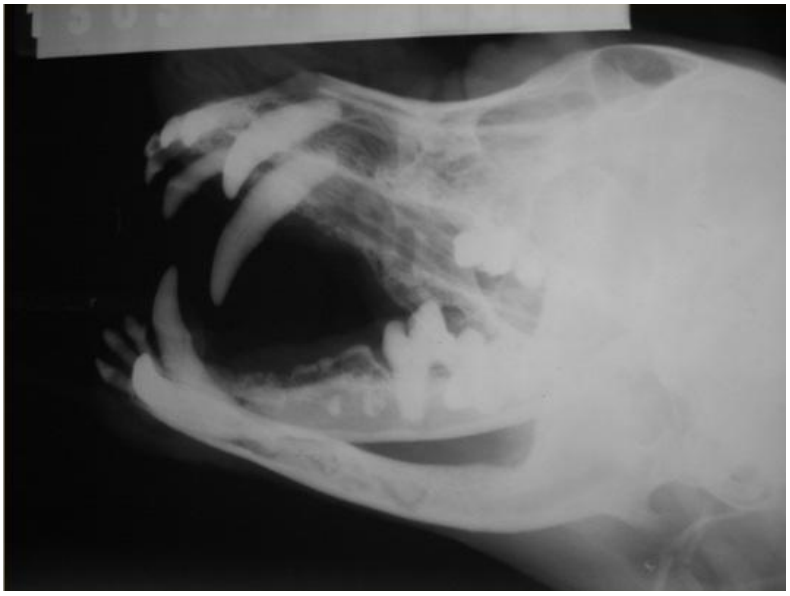


Table 1. Patient´s hematological and biochemical parameters three months before loss of diabetes control, at the time when active periodontal disease was diagnosed and three weeks and six months after periodontal treatment and nineteen teeth extraction.

Parameter	Three mo before	Periodontal diagnosis	Three wk after prophylaxis	Six mo after prophylaxis
Eritrocytes ($x10^6$/µL)	5.65	5.9	6.39	6.72
Ht (%)	42	42	45	49
Hb (g%)	14.5	15	14.8	16.4
Leucocyte count (µL)	8.200	21.300	14.200	12.000
Seg neutrophil (µL)	5.658	15.975	8.662	8.760
Eosinophil (µL)	82	0	852	360
Lymphocytes (µL)	2.132	4.047	3.408	2.280
Monocytes (µL)	328	1.278*	1.278	600
Glucose (mg/dL)	166 6 h AII	419 2 h AII	120 8 h AII	136 7 h AII
Fructosamin (µmol/L)	318	379	319	299
Albumin (g/L)	35	40	-	27.9
ALT (U/L)	43	493	308	125
ALP (U/L)	115	< 20	114	177
Creatinin (mg/dL)	0.6	0.49	-	1.02
Glucosuria (cross system)	traces	3+/4+	1+	Traces

mo = month. wk = week. h = hour. AII = After insulin injection. * Activated Monocytes.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados e informações apresentadas neste trabalho salientam uma abordagem ainda pouco difundida na medicina veterinária, mas que tem ganhado cada vez mais força na medicina: a atuação dos profissionais na conscientização e prevenção contra o desenvolvimento de diabetes. Os dados e observações aqui levantados permitiram inclusive a elaboração de um material informativo, promovido pela Royal Canin, e pela Associação Brasileira de Endocrinologia Veterinária, que foi idealizado para o dia 14 de novembro de 2011, dia mundial de prevenção contra o diabetes, com o título "Diabetes mellitus em cães e gatos: é possível prevenir?" O intuito deste material foi alertar veterinários com relação à necessidade de orientação dos clientes neste sentido.

É interessante o fato de que mesmo tendo uma origem multifatorial, e frequentemente associada à perda de massa de células beta, a DMC apresenta diferentes fatores de risco ambientais que podem ser evitados, como, alimentação desequilibrada, abuso de petiscos, sobrepeso, sedentarismo, inflamação crônica e diestro, por exemplo. Apesar disto, os mecanismos por trás destas associações ainda precisam ser mais bem estudados. O fato é que apesar de muitos destes fatores serem associáveis à diabetes tipo 2 em humanos, o estado da arte atual da DMC não permite afirmar a existência desta forma da doença em cães, como é documentada em humanos e felinos.

A motivação para realização deste estudo, especialmente o estudo caso-controle, iniciou há cerca de 8 anos, a partir da elaboração do trabalho de Pöppl & González (2005), onde diversos dos fatores aqui trabalhados mostraram-se importantes naquela avaliação preliminar com um número reduzido de casos prevalentes. No entanto, com o passar dos anos, a pratica clinica endocrinológica sempre manteve em evidência um perfil típico do cão diabético em nosso meio, normalmente uma fêmea, com idade acima de 7 anos, e com histórico de diestro recente, sobrepeso, e alimentação desequilibrada ou rica em petiscos. Fez-se importante então a comparação destes pacientes com um grupo controle para avaliar se este perfil não era simplesmente o perfil da população em geral. Estes resultados aqui demonstrados permitiram a associação de tais fatores como importantes fatores de risco ao

desenvolvimento da doença. Da mesma forma, os resultados permitem preconizar a castração de fêmeas, manutenção de um índice de escore corporal ideal, e alimentação equilibrada com dieta comercial exclusivamente como fatores de proteção ao desenvolvimento da doença.

Neste sentido, a aplicação de ferramentas de investigação epidemiológicas se mostrou de grande valor no presente trabalho, permitindo não só o desenvolvimento de um questionário a ser aplicado em pacientes em atendimento, com o objetivo de identificar exposição a fatores de risco, mas também a preconização de uma padronização na abordagem inicial dos pacientes ao criar um "*checklist*" de fatores a serem avaliados num paciente diabético recém-diagnosticado. A avaliação da acurácia desta ferramenta em cima das fichas de atendimento inicial destes pacientes foi fundamental em alertar para possíveis vieses de aferição do questionário. Algumas questões importantes, como diestro e sobrepeso, por exemplo, pode ser de difícil reconhecimento pelos proprietários, o que é minimizado quando o questionário é aplicado a casos incidentes. Contudo, as informações coletadas sobre os hábitos alimentares foram bastante fiéis aos registros inicias dos pacientes, refletindo que talvez por tratar-se de um aspecto mais cultural, estas variáveis foram melhor avaliadas retrospectivamente com o questionário.

No que diz respeito ainda às interações entre ciclo estral, resistência insulínica, e predisposição à diabetes, os resultados aqui demonstrados salientam a magnitude que o fator de risco diestro apresenta na etiologia da DMC em nosso meio. Isto é bastante contrastante com a realidade observada nos livros-texto estrangeiros (FELDMAN & NELSON, 2004; NELSON, 2004; DAVISON, 2012), redigidos por autores americanos ou europeus, onde a prática da castração é estimulada e seguida como método de controle populacional. O estudo retrospectivo em busca de casos de remissão de DMC após castração visou demonstrar o lado clínico das associações estudadas pelo nosso grupo entre 2006 e 2008 (PÖPPL, *et al*., 2009b; PÖPPL, *et al*., 2009c; PÖPPL, *et al*. 2012a). Estudos com este delineamento, apesar de serem considerados frágeis do ponto de vista epidemiológico, podem ser bastante úteis, como na presente Tese, para ilustrar situações clínicas de interesse.

A documentação destes casos de remissão reforça, do ponto de vista de patogênese, que a castração não só previne a DMC nas fêmeas, como também pode

trazer a remissão da condição ao remover uma importante fonte de antagonismo as ações da insulina. Apesar de que, o efetor principal da resistência à insulina nestes casos é o GH secretado pela glândula mamária em resposta à progesterona (EIGENMANN *et al.*, 1988; SELMAN *et al*., 1994; FALL *et al*., 2010). A remissão do diabetes em alguns casos, mesmo com a castração tendo sido realizada semanas após o diagnóstico, evidenciam que as células beta de algumas pacientes podem sofrer exaustão por glicotoxicidade, porém mantem a capacidade de secreção se lhes for permitido um novo estado de sensibilidade à insulina.

Casualmente, as pacientes que levaram mais tempo para sofrer remissão, e que também levaram mais tempo para ser castradas, apresentavam associado ao diestro, a existência de uma condição inflamatória – hiperplasia endometrial cística - piometra. Na mesma óptica, o relato de uma periodontite severa atrapalhando o controle glicêmico de uma paciente diabética, e as recentes associações entre excessiva adiposidade e estado inflamatório sistêmico (GERMAN, *et al*., 2009, KIL & SWANSON, 2009; WAKSHLAG, *et al*., 2011), acendem atenção a necessidade de melhor compreensão dos diferentes mecanismos pelos quais inflamação crônica possa estar relacionada a patogênese da DMC.

Enfim, consideramos atingidos os objetivos iniciais deste trabalho ao demonstrar que dieta desequilibrada, obesidade, abuso de petiscos, e diestro são importantes fatores de risco ao desenvolvimento de DMC. No entanto, os fatores sedentarismo e periodontite não se mostraram signficativos como fatores de risco, apesar de existir plausabilidade para orientar cuidados quanto a estes fatores no manejo dos pacientes. Com relação aos fatores de proteção, a castração de fêmeas, e alimentação estrita a base de ração mostraram-se importantes, não tendo sido demonstrada significância estatística para os fatores de proteção saúde oral, e atividade física frequente. Porém da mesma forma, existe plausabilidade biológica para inclusão destas orientações como ferramentas para uma vida saudável e contra o desenvolvimento de diabetes.

Quanto a criação de um questionário como ferramenta de avaliação dos pacientes diabéticos, consideramos uma ferramenta adequada, respeitadas suas limitações em casos prevalentes, podendo o mesmo vir a ser usado em estudos futuros, e também deve ser usado no dia-a-dia de atendimento de pacientes diabéticos recém-

diagnósticados. O modelamento estatístico aplicado no estudo caso-controle se mostrou adequado na afirmação de quais são os fatores mais importantes, bem como a série de casos de remissão de diabetes e o relato de descompensação da diabetes secundária a uma periodontite reforçaram a importância destes fatores (diestro e inflamação crônica) como causa de resistência à insulina e predisposição à diabetes.

Assim, assume-se que as orientações de manutenção de um estilo de vida saudável, com manutenção de um peso ideal, dieta equilibrada, castração precoce em fêmeas, cuidados com a saúde oral e manutenção de um bom nível de atividade física devem ser fomentadas junto a clientes e colegas com objetivo de estimular uma concientização contra a diabetes, e assim tentar reduzir a incidência de novos casos no futuro em decorrência de fatores de risco ambientais.

——— /// ———

REFERÊNCIAS ADICIONAIS

ALVES, C.; ANDION, J.; BRANDÃO, M.; MENEZES, R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 51, n. 7, p. 1050-1057, 2007.

APTEKMANN, K. P.; SCHWARTZ, D.S. A survey of owner attitudes and experiences in managing diabetic dogs. **The Veterinary Journal**. v. 190, p. 122-124, 2011.

AYUSO, E.; CHILLÓN, M.; GARCÍA, F.; AGUDO, J.; ANDALUZ, A.; CARRETERO, A.; MONFAR, M.; MOYA, M.; MONTANÉ, J.; OTAEGUI, P. J.; BOSH, F. In vivo gene transfer to healthy and diabetic canine pâncreas. **Molecular Therapy**. v.13, n. 4, p. 747-755, 2006.

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 hypoglicemia. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. v. 289, p. R1064-R1073, 2005.

BAGLEY, L. H.; LAVACH, J. D. Comparison of postoperative phacoemulsification resultus in dogs with and without diabetes mellitus: 153 cases (1991-1992). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 205, n. 8, p. 1165-1169, 1994.

BEAM, S.; CORREA, M. T.; DAVIDSON, M. G. A retrospective-cohort study on the development of cataracts in dogs with diabetes mellitus: 200 cases. **Veterinary Ophthalmology**. v. 2, p. 169-172, 1999.

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

BEHREND, E. N. Update on drugs used to treat endocrine diseases in small animals. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 36, p. 1087-1105, 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 Resarch**. v. 31 n. 1-2, p. 94-99; 1989.

BOYSEN, S. R. Fluid and electrolyte therapy in endocrine disorders: diabetes mellitus and hypoadrenocorticism. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 38, p. 699-717, 2008.

BRENNER, K.; HARKIN, K. R.; ANDREWS, G. A.; KENNEDY, G. Juvenile pancreatic atrophy in Greyhounds: 12 cases (1995-2000). **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 23, p. 67-71, 2009.

CASELLA, M.; WESS, G.; HÄSSIG, M.; REUSCH, C. E. Home monitoring of blood glucose concentration by owners of diabetic dogs. **Journal of Small Animal Practice**. v. 44, p. 298-305, 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, p. 1948-1956; 2005.

CHERRINGTON, A. D. Central versus peripheral glucose sensing and the response to hypoglycemia. **Diabetes**. v. 57, p. 1158-1159, 2008.

CHIBALIN, A. V.; JEFFREY, M. Y.; RYDER, J. W.; SONG, X. M.; GALUSKA, D.; KROOK, A. Exercise-induced chandes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**. v. 97, n. 1, p. 38-43, 2000.

CONNOLLY, C. C.; AGLIONE, L. N.; SMITH, M. S.; LACY, B.; MOORE, M. C. Insulin action during late pregnancy in the conscious dog. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism.** v. 286, p. E909-E915, 2004.

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

DAVISON, L. J.; RISTIC, J. M. E.; HERRTAGE, M. E.; RAMSEY, I. K.; CATCHPOLE, B. Anti-insulin antibodies in dogs with naturally occuring diabetes mellittus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 91, p. 53-60, 2003.

DAVISON, L. J.; WALDING, B.; HERRTAGE, M. E.; CATCHPOLE, B. Anti-insulin antibodies in diabetic dogs before and after treatment with different insulin preparations. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 22, n. 6, p. 1317-1325, 2008.

DAVISON, L. J.; WEENINK, S. M.; CHRISTIE, M. R. HERRTAGE, M. E.; CATCHPOLE, B. Autoantibodies to GAD65 and IA-2 in canine diabetes mellitus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 126, n. 1-2, p. 83-90, 2008.

DAVISON L. J. Canine diabetes mellitus. In: MOONEY, C. T.; PETERSON, M. E. (Eds.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology**. 4rd Ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Medical Association, 2012. p. 116-132.

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, p. 324-336, 2005.

DUROCHER, L. L.; HINCHCLIFF, K. W.; DiBARTOLA, S. P.; JOHNSON, S. E. Acid-base and hormonal abnormalities in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.232, n. 9, p. 1310-1320, 2008.

EDAMURA, K.; ITAKURA, S.; NASU, K.; IWAMI, Y.; OGAWA, H.; SASAKI, N.; OHGAWARA, H. Xenotransplatation of porcine pancreatic endocrine cells to total pancreatectomizaded dogs. **Journal of Veterinary Medical Sciences**. v. 65, n. 5, p. 549-556, 2003.

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

EISENBARTH, G. S.; POLONSKY, K. S.; BUSE, J. B. Type 1 diabetes mellitus. In: KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R. **Williams Textbook Endocrinology**. 11ed. Philadelphia: Saunders. p. 1391-1416, 2008.

ENGEBRESTON, S. P.; HAY-HADAVI, J.; EHRHARDT, F. J. Gingival cravicular fluid levels of interleukin-1β and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. **Journal Periodontology**. v. 75, n. 9, p. 1203-1208, 2004.

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

FALL, T., HAMLIN, H. H., HEDHAMMAR, A., KÄMPE, O. & EGENWALL, A. Diabetes mellitus in a population of 180,000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 21, p. 1209-1216, 2007.

FALL, T.; HOLM, B.; KARLSSON, A.; AHLGREN, K. M.; KÄMPE, O.; VON EULER, H. Glucagon stimulation test for estimating endogenous insulin secretion in dogs. **The Veterinary Record**. v.163, p. 266-270, 2008.

FALL, T., KREUGER, S. J., JUBERGET, A., BERGSTRÖM, A., HEDHAMMAR, A. Gestational diabetes mellitus in 13 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 22, p. 1296-1300, 2008.

FALL, T., HEDHAMMAR, A., WALLBERG, A., FALL, N., AHLGREN, K.M., HAMLIN, H.H., LINDBLAD-TOH, K., ANDERSSON, G.; KÄMPE, O. Diabetes Mellitus in Elkhounds is associated with diestrus and pregnancy. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v. 24, p. 322-1328, 2010.

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.

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

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

FLEEMAN, L. M.; RAND, J. S.; MORTON, J. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of porcine insulin zinc suspension in eigth diabetic dogs. **The Veterinary Record**. v.164, p. 232-237, 2009.

FLEEMAN, L. M. Continuous monitoring of glucose concentration in diabetic dogs. **The Veterinary Record**. v.169, p. 204-205, 2011.

FRACASSI, F., PIETRA, M., BOARI, A., ASTE, G., GIUNTI, M.; FAMIGLI-BERGAMINI, P. Breed distribution of canine diabetes mellitus in Italy. **Veterinary Research Communications**. v. 28, p. 339-342, 2004.

FRACASSI, F.; BORETTI, F. S.; SIEBER-RUCKSTUHL, N. S.; REUSCH, C. E. Use of insulin glardine in dogs with diabetes mellitus. **The Veterinary Record**. v.170, p. 52-55, 2012.

FREYSE, E. J.; REBRIN, K.; PETRZIKA, M. FISCHER,U. Increased urea synthesis in insulin-dependent diabetic dogs maintained normoglycemic: effect of portal insulin administration and food protein content. **Diabetes.** v. 45, p. 667-673, 1996.

FUKUTA, H.; MORI, A.; URUMUHAN, N.; LEE, P.; ODA, H.; SAEKI, K.; KURUSHIMA, M.; NOZAWA, S.; MIZUTANI, H.; MISHINA, S.; ARAI, T.; SAKO, T. Characterization of insulin resistance induced by Cushing syndrome or diestrus against healthy control dogs as determined by euglycemic-hyperinsulinemic glucose clamp profile glucose infusion rate using an artificial pancreas apparatus. **The Journal of Veterinary Medical Science**. In press, Jul 6, 2012

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

GERMAN, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats. **Journal of Nutrition**. v. 136, p. 140-146, 2006.

GERMAN, A. J.; HERVERA, M.; HUNTER, L.; HOLDEN, S. L.; MORRIS, P. J.; BIOURGE, V.; TRAYHURN, P. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. **Domestic Animal Endocrinology.** v. 37, p. 214-226, 2009.

GILOR, C.; GRAVES, T. K. Synthetic insulin analogs and their use in dogs and cats. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 40, p. 197-307, 2010.

GRAHAM, P. A.; MASKELL, I. E.; RAWLINGS, J. M.; NASH, A. S.; MARKWELL, P. J. Influence of a high fibre diet on glycaemic control and quality of life in dogs with diabetes mellitus. **Journal of Small Animal Practice**. v. 43, p. 67-73, 2002.

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

GRECO, D. S. Diagnosis and treatment of juvenile endócrine 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.

GRIMBLE, R. F. Inflammatory status and insulin resistance. **Current Opinion Clinical Nutrition and Metabolic Care.** v. 5, p. 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.

HE, J.; USUI, I.; ISHIZUKA, K.; KANATANI, Y.; HIRATANI, K.; IWATA, M.; BUKHARI, A.; HARUTA, T.; SASAOKA, T.; KOBAYASHI, M. Interleukin-1β inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Endocrinology**. v. 20, p. 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 β-cell dysfunction and damage by isolated rat and human islets. **The Journal of Biological Chemistry** . v. 279, n. 51, p. 53145–53151, 2004.

HESS, R. B.; WARD, C. R. Effect of insulin dosage on glycemic response in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993-1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 216, n. 2, p. 217-221, 2000.

HESS, R. B.; SAUNDERS, H. M.; Van WINKLE, T. J.; WARD, C. R. Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993-1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 216, n. 8, p. 1166-1173, 2000.

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.

HESS, R. S.; ILAN, I. Renal abcess in a dog with transient diabetes mellitus. **Journal of Small Animal Practice**. v. 44, p. 13-16, 2003.

HESS, R. S.; KASS, P. H.; Van WINKLE, T. J. Association between diabetes mellitus, hypothyreoidism or hyperadrenocorticismo, and atherosclerosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 17, n. 4, p. 489-494, 2003.

HESS, R. S. Insulin resistance in dogs. **Veterinary Clinics Small Animal.** v. 40, p. 309-316, 2010.

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

HOFER-INTEEWORN, N.; PANCIERA, D. L.; MONROE, W. E.; SAKER, K. E.; DAVIES, R. H.; REFSAL, K. R.; KEMNITZ, J. W. Effect of hypothyroidism on insulin sensitivity and glucose tolerance in dogs. **American Journal of Veterinary Research.** v. 73, n. 4, p. 529-538, 2012.

HORN B., MITTEN R. W. Evaluation of an insulin zinc suspension for control of naturally occurring diabetes mellitus in dogs. **Australian Veterinary Journal**. v. 78, p. 831-834, 2000.

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

IMAMURA, T.; KOFFLER, M.; HELDERMAN, J. H.; PRINCE, D.; THIRLBY, R.; INMAN, L.; UNGER, R. H. Severe diabetes induced in subtotally depancreatized dogs by sustained hyperglycemia. **Diabetes**. v. 37, p. 600-609, 1988.

ISHIOKA, K.; OMACHI, A.; SAGAWA, M.; SHIBATA, H.; HONJOH, T.; KIMURA, K.; SAITO, M. Canine adiponectin: cDNA structure, mRNA expression in adipose tissues and reduced plasma levels in obesity. **Research in Veterinary Science**. v. 80, p. 127-132, 2006.

INOZHEB, B.; ANSEROB, E.M. Activity of some enzymes in the gingiva of dogs with alloxan diabetes. **Stomatologiia (Sofiia)**. v. 55, n. 1, p. 7-11, 1973.

JAGER, J.; GRÉMEAUX, T.; CORMONT, M.; MARCHAND-BRUSTEL, Y. L. E.; TANTI, J. F. Interleukin-1β−induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of IRS-1 expression. **Endocrinology**. v. 148, p. 241-251, 2007.

JOHNSON, C. A. Glucose homeostasis during canine pregnancy: insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. **Theriogenology**. v. 70, p. 1418-1423, 2008.

JOUVION, G.; ABADIE, J.; BACH, J. M.; ROUX, F.; MICLARD, J.; DESCHAMPS, J. Y.; GUIGAND, L.; SAÏ, P.; WYERS, M. Lymphocytic insulitis in a juvenile dog with diabetes mellitus. **Endocrine Pathology**. v. 17, n. 3, p. 283-90, 2006.

KAIYALA, K. J.; PRIGEON, R. L.; KAHN, S. E.; WOODS, S. C.; PORTE, T.; SCHWARTEZ, M. W. Reduced β-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 asscociated 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, 2008. 932 p.

KANG, J. H.; NA, K. J.; MO, I. P.; CHANG, D.; YANG, M. P. Juvenile diabetes mellitus accompained by exocrine pancreatic insufficiency in a dog. **The Journal of Veterinary Medical Sciences**. v.70, n. 12, p. 1337-1340, 2008.

KENNEDY, L. J.; DAVISON, L. J .; BARNES, A.; SHORT, A. D.; FRETWELL, N.; JONES, C. A.; LEE., A. C.; OLLIER, W. E. R.; CATCHPOLE, B. Identification of susceptibility and protective major histocompatibility complex haplotypes in canine diabetes mellitus. **Journal Compilation**. v.68, p. 467-476, 2006.

KIL, D. Y.; SWANSON, K. S. Endocrinology of obesity. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice.** v. 40, p. 205-219, 2010.

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, n. 24, p. 23173–23183, 2005.

KIMMEL, S. E.; MICHEL, K. E.; HESS, R. S.; WARD, C. R. Effects of insoluble and soluble dietary fiber on glycaemic control in dogs with naturally occuring insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 216, n. 7, p. 1076-1081, 2000.

KING, G. L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. **Journal Periodontology**. v. 79, n. 8, p. 1527-1534, 2008.

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, p. 1985S-1987S; 2006.

KOIVISTO, V.; SOMAN, V.; NADEL, E.; TAMBORLANE, W.V.; FELIG, P. Exercise and Insulin: insulin binding, insulin mobilization, and counterrregulatory hormone secretion. **Federation Proceedings.** v. 39, p. 1481-1486, 1980.

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

LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A. Neutrophil adherence and movement in poorly and well-controlled diabetic dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 45, p. 1498-1500, 1984.

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

MADDEN, T. E.; HERRIGES, B.; BOYD, L.; LAUGHLIN G.; CHIODO, G. T.; ROSENSTEIN, D. I. Alterations in HbA1c following minimal or enhanced non-surgical, non-antibiotic treatment of gingivitis or mild periodontitiss in type 2 diabetic patientes: a pilot trial. **The Journal of Contemporary Dental Practice**. v. 9, n. 5, p 1-13, 2008.

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 β-cell production of IL-1β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **Journal of Clinical Investigation**. v. 110, p. 851-860, 2002.

MAGGIORE, A. D.; NELSON, R. W.; DENNIS, J.; JOHNSON, E.; KASS, P. H. Efficay of protamine zinc recombinant human insulin for controlling hyperglycemia in dogs with diabetes mellitus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.26, p. 109-115, 2012.

MARED, M.; CATCHPOLE, B.; KÄMPE, O.; FALL, T. Evaluation of circulating concentrations of glucose homeostasis biomarkers, progesterone, and growth hormone in healthy Elkhounds during anestrus and diestrus. **American Journal of Veterinary Research**. v. 73, p. 242-247, 2012.

MAZZI, A.; FRACASSI, F.; DONDI, F.; GENTILINI, F.; BERGAMINI, P. F. Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. **Veterinary Research Communication**. v.32, p. S299-S302, 2008.

MATSSON, L.; ATTSTRÖM, R.; GRANATH, L. Inflammatory reactions in the gingival region during the development of bacterial plaque in alloxan-diabetic dogs. **Journal of Periodontal Research**. v. 15, n. 5, p. 516-524, 1980.

MATSUO, Y.; SHIMODA, S.; SAKAKIDA, M.; NISHIDA, K.; SEKIGAMI, T.; ICHIMORI, S.; ICHINOSE, K.; SHICHIRI, M.; ARAKI, E. Strict diabetic control in diabetic dogs with closed-loop intraperitoneal insulin algorithm designed for an artificial endocrine pancreas. **Journal of Artificial Organs**. v.6, p. 55-63, 2003.

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.

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

MEALEY, B. L. Periodontal disease and diabetes. **Journal of the American Dentistry Association**. v. 137, v. 26S-31S, 2006.

MICELI, D. D.; GALLELLI, M. F.; CABRERA BLATTER, M. F.; MARTIARENA, B.; BRAÑAS, M. M.; ORTEMBERG, L. R.; GÓMEZ, N. V.; CASTILLO, V. A. Low dose of insulin detemir controls glycaemia, insulinemia and prevents diabetes mellitus progression in the dog with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Research in Veterinary Science**. v.93, p. 114-120, 2012.

MOLLER, D.; FLIER, J. S. Insulin resistance. Mechanisms, syndromes, and implications. **New England Journal of Medicine**. v. 325, n. 13, p. 938-948, 1991.

MORGAN M. J.; VITE, C. H.; RADHAKRISHNAN, A.; HESS, R. S. Clinical peripheral neuropathy associated with diabetes mellitus in 3 dogs. **Canadian Veterinary Journal**. v. 49, p. 583-586, 2008.

MORI, A.; LEE, H.; MOTOIKE, T.; IWASE, K.; KANAYA, Y.; FUKUTA, H.; MIZUTANI, H.; ARAI, T. Comparison of time-action profiles of insulin glardine and NPH insulin in normal and diabetic dogs. **Veterinary Research Communications**. v.32, p. 563-573, 2008.

MORI, A.; SAGARA, F.; SHIMIZU, S.; MIZUTANI, H.; SAKO, T.; HIROSE, H.; YOSHIMURA, I.; UEMATSU, Y.; YAMAGUCHI, T.; ARAI, T. Changes in peripheral lymphocyte subsets in the type 1 diabetic dogs treated with insulin injections. **The Journal of Veterinary Medical Sciences**. v.70, n. 2, p. 185-187, 2008.

MORI, A.; LEE, H.; TAKEMITSU, H.; SAKO, T.; ARAI, T. Comparison of insulin signalling gene expression in insulin sensitive tissues between cats and dogs. **Veterinary Research Communications**. v. 33, p. 211-226, 2009.

MORI, A.; LEE, H.; SAKO, T.; MIZUTANI, H.; ARAI, T. Sucessful intensive insulin treatment of type 1 diabetic dogs leads to restoration of peripheral leukocyte insulin signaling gene expression and enzyme actvities. **The Journal of Veterinary Medical Sciences**. v.71, n. 8, p. 1017-1026, 2009.

NELSON, R. W. Canine diabetes mellitus. In: MOONEY, C. T.; PETERSON, M. E. (Eds.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology**. 3rd Ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Medical Association, 2004. p. 112-129.

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

NIESSEN, S. J. M.; GUITIAN, P. J.; NIESSEN, A. P. M.; PION, P. D.; SHAW, J. A. M.; CHURCH, D. B. Evaluation of a quality-of-life tool for dogs with diabetes mellitus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 26, p. 953-961, 2012.

NIESSEN, S. J. M.; FERNANDEZ-FUENTE, M.; MAHMOUD, A.; CAMPBELL, S.C.; ALDIBBIAT, A.; HUGGINS, C.; BROWN, A. E.; HOLDER, A.; PIERCY, R. J.; CATCHPOLE, B.; SHAW, J. A. M.; CHURCH, D. B. Novel diabetes mellitus treatment: mature canine insulin production by canine striated muscle through gene therapy. **Domestic Animal Endocrinology**. v.43, p. 16-25, 2012.

NIEMIEC, B.A. Peridontal disease. **Topics on Companion Animal Medicine**. v. 23, n. 2, p. 72-80, 2008.

NOVELLAS, R.; GOPEGUI, R.R.; ESPADA, Y. Determination of renal vascular resistance in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. **Vet Rec**. v. 163, p. 163: 592-596, 2008.

O´DRISCOLL, L.; GAMMELL, P.; CLYNES, M. Mechanisms associated with loss of glucose responsiveness in beta cells. **Transplantation Proceedings**. v. 36, p. 1159-1162, 2004.

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 β-cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 4, p. 41271-41274, 2004

PALM, C. A.; BOSTON, R. C.; REFSAL, K. R.; HESS, R. S. An investigation of the action of neutral protamine hagedorn human analogue insulin in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 23, p. 50-55, 2009.

PAUL, A. E. H.; SHIEL, R. E.; JUVET, F.; MOONEY, C. T.; MANSFIELD, C. S. Effect of hematocrit on accuracy of two point-of-care glucometers for use in dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 72, n. 9, p. 1204-1208, 2011.

PETERSON, M. E.; ALTSZULER, N.; NICHOLS, C. E. Decreased insulin sensitivity and glucose tolerance in spontaneous canine hyperadrenocorticism. **Research in Veterinary Science**. v. 36, p. 177-182, 1984.

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

PLUMMER, C.E.; SPECHT, A.; GELATT, K.N. Ocular manifestation of endocrine disease. **Compendium**. p.733-43, Dez 2007.

PÖPPL, A. G.; GONZÁLEZ, F. H. D. Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 33, n. 1, p. 33-40, 2005.

PÖPPL. A. G.; VEIGA, A.; GONZÁLEZ, F. H. D. Patologia clínica em cães com diabetes mellitus: valores de referência para triglicerídeos e fructosamina. **Revista da Universidade Rural. Série Ciências da Vida**. v. 25, p. 145-147, 2005.

PÖPPL, A. G.; OLIVEIRA, S. T.; SORTICA, M. S.; FERREIRA, R.R.; BARBOSA, P. R.; LACERDA, L. A.; GONZÁLEZ, F. H. D. Avaliação clínico-laboratorial de uma preparação de insulina suína lenta no controle de cães diabéticos. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 34, n. 2, p. 125-35, 2006.

PÖPPL, A. G.; MÜLLER, F.; QUEIROGA, L.; OLIVEIRA, I. Insulin resistance due to periodontal disease in na old diabetic female poodle. In: 34th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, São Paulo. **Clínica Veterinária**. Ano XIV, suplemento, p. 116, 2009.

PÖPPL, A. G.; VALLE, S. C.; GONZÁLEZ, F. H. D.; BECK, C. A. C.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. Effect of estrus cycle and pyometra on insulin receptor titorine kinase activity and insulin receptor binding in female dogs. In: 34th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, São Paulo. **Clínica Veterinária**. Ano XIV, suplemento, p. 136-138, 2009.

PÖPPL, A. G.; LASTA, C. S.; GONZÁLEZ, F. H. D.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. Insulin sensitivity indexes in female dogs: effect of estrus cycle and pyometra. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, p. 341-350, 2009.

PÖPPL, A. G.; VALLE, S. C.; GONZÁLEZ, F. H. D.; BECK, C. A. C.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. Estrus cycle effect on muscle tyrosine kinase activity in bitches. **Veterinary Research Communications**. v. 36, p. 81-84, 2012.

PÖPPL, A. G.; NUNES, N.; TESSARIOLI, M.; PIGATTO, J. A. T. Diabetes mellitus juvenil em um Dashchund. In: 2° Congresso Internacional da Associação Brasileira de Endocrinologia Veterinária, Búzios. **Clínica Veterinária**. Ano XVII, suplemento, p. 35, 2012.

RADIN, M. J.; SHAREY, L. C.; HOLYCROSS, B. J. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. **Veterinary Clinical Pathology**. v.38, n. 2, p. 136-156, 2009.

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, p. 2072S-2080S, 2004.

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, p 28-32, 2003.

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

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

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

ROCK, M.; BABINEC, P. Diabetes in people, cats and dogs: biomedicine and manifold ontologies. **Medical Anthropology.** v. 27, n. 4, p. 324-352, 2008.

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

RYAN M. E.; CARNU, O.; KAMER, A. The influence of diabetes on the periodontal tissues. **Journal of the American Dentistry Association**. v. 134, p. 34S-40S, 2003.

SAKO T, MORI A, LEE P, ODA H, SAEKI K, MIKI Y. Time-actions profiles of insulin detemir in normal and diabetic dogs. **Research in Veterinary Science**. v. 90, p. 396-403, 2011

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

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, p. 169-180, 1997.

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.

SHIP, J.A. Diabetes and oral health. **Journal of the American Dentistry Association**. v. 134, p. 4S-10S, 2003.

SHORT, A. D.; CATCHPOLE, B.; KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; FRETWELL, N.; JONES, C.; THOMSON, W.; OLLIER, W. E. R. Analysis of candidate susceptibility genes in canine diabetes. **Journal of Heredity**. v. 98, n. 5, p. 518-525, 2007.

SHORT, A. D.; CATCHPOLE, B.; KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; LEE, A. C.; JONES, C.; FRETWELL, N.; OLLIER, W. E. R. T cell cytokine gene polymorphisms in canine diabetes mellitus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.128, p. 137-146, 2009.

SKAMAGAS, M.; BREEN, T. L.; LeROITH, D. Update on diabetes mellitus: prevention, treatment, and association with oral diseases. **Oral Diseases**. v.14, p. 105-114, 2008.

SOUZA, A. A.; OLIVEIRA, B. A.; BENJAMIM, S. M. J.; 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 amloyd polipeptide amide causes pheriferal 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, n. 2, p. 253-266, 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, n. 4, p. 453-458, 2006.

TAYLOR, G. W. The effects of periodontal treatment on diabetes. **Journal of the American Dentistry Association**. v. 134, p. 41S-48S, 2003.

TRAPO, S. M.; NETO, J. H. Complicações da insulinoterapia em cães com diabete melito. **MedveP – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**. v. 3, n. 10, p. 123-127, 2005.

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

VAN NICE, E. Management of multiple dental infections in a dog with diabetes mellitus. **Journal of Veterinary Dentistry**. v. 23, n. 1, p. 18-25, 2006.

VERKEST, K. R., FLEEMAN, L. M., MORTON, J. M., ISHIOKA, K. & RAND, J. S. Compensation for obesity induced insulin resistance in dogs: assessment of the effects of leptin, adiponectin and glucagon-like peptide-1 using path analysis. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 41, p. 24-34, 2011.

VERKEST, K. R., RAND, J. S., FLEEMAN, L. M., MORTON, J. M., RICHARDS, A. A., ROSE F. J. & WHITEHEAD, J. P. (2011) Distinct adiponectin profiles might contribute to differences in susceptibility to type 2 diabetes in dogs and humans. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 41, p. 67-73, 2011

VERKEST, K. R., RAND, J. S., FLEEMAN, L. M. & MORTON, J. M. Spontaneously obese dogs exhibit greater postprandial glucose, triglyceride, and insulin concentration than lean dogs. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 42, p. 103-112, 2012.

WACHLIN, G.; AUGSTEIN, P.; SCHRODER, D.; KUTTLER, B.; KLO TING, I.; HEINKE, P.; SCHMIDT, S. IL-1β, IFN-γ and TNF-α increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. **Journal of Autoimmunity**. v. 20, p. 303–312, 2003.

WAKSHLAG, J. J.; STRUBLE, A. M.; LEVINE, C. B.; BUSHEY, J. J.; LAFLAMME, D. P.; LONG, G. M. The effects of weight loss on adipokines and markers of inflammation in dogs. **British Journal of Nutrition**. v. 106, p. 11-14, 2011.

WEJDMARK, A. K., BONNET, B., HEDHAMMAR, A.; FALL, T. Lifestyle risk factors for progesterone-related diabetes mellitus in Elkhounds – a case-control study. **Journal of Small Animal Practice**. v. 52, p. 240-245, 2011.

WIEDMEYER, C. E.; DECLUE, A.E. Continuous glucose monitoring in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 22, p. 2-8, 2008

WHITLEY, N. T.; DROBATZ, K. J.; PANCIERA, D. L. Insulin overdose in dogs and cats: 28 cases (1986-1993). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 221, n. 3, p. 326-330, 1997.

APÊNDICE I

Paciente:_____ Proprietário: _____

Telefones:_____Data diagnóstico (Aprox)_____

SALIENTAR QUE AS RESPOSTAS DEVEM REFERIR-SE A VIDA ANTES DE DESENVOLVER DM

1) Qual era a principal forma de alimentação do cão? ( )

1) Exclusivamente ração comercial 2) Exclusivamente comida caseira 3) Comida caseira + ração comercial

2) Quantas vezes por dia o cão era alimentado? ( )

1) 1x/dia 2) 2x/dia 3) 3x/dia 4) 4 ou mais x/dia 5) Comida a vontade

3) O cão costumava receber petiscos/guloseimais para cães (biscoitos, palitinhos, ossinhos, bifinhos, chocolate para cães, salgadinhos para cães, refrigerante para cães)? ( )

1) Nunca 2) Mensalmente 3) Semanalmente 4) Diariamente 5) Algumas vezes por dia

4) O cão costumava receber alimentos humanos (frios, pães, carnes, gordura, chocolates, refrigerante, sorvete, salgadinhos, biscoitos, bolacha recheada, pipoca) enquanto os donos faziam suas refeições? ( )

1) Nunca 2) Mensalmente 3) Semanalmente 4) Diariamente 5) Algumas vezes por dia

5)Qual era o nível de atividade do cão? ( )

1) Calmo 2) Moderadamente ativo 3) Ativo 4) Hiperativo

6) Qual era a quantidade média de passeios do animal? ( )

1) Diariamente 2) Mais de uma vez por semana 3) Semanalmente 4) Menos que uma vez por semana 5) Não passeia

7) Com que frequência aproximada o cão era exposto à atividade física intensa (corridas, passeios acompanhando dono de bicicleta, caminhadas de mais de 30 minutos, agility, caça, adestramento, guarda, brincadeiras com bolinha ou afins por mais de 20 minutos)?( )

1) Nunca 2) Semanalmente 3) Mais que uma vez por semana 4) Mensalmente 5) Esporadicamente

8) Qual era o índice de condição corporal do cão, baseado na escala ilustrada previamente apresentada? ( )

1) caquético 2) sub-peso 3) peso ideal 4) sobrepeso 5) obeso

9) O cão apresentava tártaro (cálculos dentários, placa) nos dentes? ( )

1) Não 2) Sim, moderado 3) Sim, intenso

10) O cão apresentava mau hálito (halitose, odor fétido na boca)? ( )

1) Não 2) Sim, moderado 3) Sim, intenso

11) Com que frequência o cão tinha seus dentes escovados? ( )

1) Nunca 2) Esporadicamente 3) Mensalmente 4) Semanalmente 5) Diariamente

12) Com que frequência o cão passava por profilaxia dentária (retirada cirúrgica de tártaro/placa dentária)? ( )

1) Nunca 2) 1 única vez 3) Ocasionalmente 4) Anualmente

13) Seu animal foi castrado antes de desenvolver diabetes? ( )

1) Não 2) Sim

AS PERGUNTAS 14 a 16 SÓ DEVERÃO SER APLICADAS EM FÊMEAS.

14) Costumava ser aplicado anti-conceptivos injetáveis (injeções para não entrar no cio, progestágenos sintéticos, anti-concepcionais)? ( )

1) Nunca 2) Ocasionalmente 3) Anualmente

15) Os cios costumavam ser regulares (era previsível em que época a fêmea entraria no cio)? ( )

1) Sim, duas vezes por ano 2) Sim, uma vez por ano 3) Não, os cios eram desencontrados 4) Não, não vinha mais apresentando cio ou não eram mais perceptíveis

16) O último cio antes do início dos sintomas de diabetes havia ocorrido há menos de 3 meses antes do início da doença? ( )

1) Não lembro 2) Sim, o último cio foi menos de 3 meses antes do início da diabetes 3) Não, o último cio foi há mais de 3 meses antes do início da diabetes

EXTRAS:

a) Em caso de óbito, data aproximada da morte?

b) O cão tinha histórico de pancreatite antes do diagnóstico? Sim ou não.

c) O cão costumava usar corticóides por via oral, injetável, colírios ou produtos de tratamento de ouvido?

1) ( ) Nunca 2) ( ) Ocasionalmente 3 ( ) Frequentemente

APÊNDICE II

Revisão de Literatura

Diestro e diabetes mellitus canina: O que há de novo?

Diestrus and canine diabetes mellitus: What's new?

Alan Gomes Pöppl - Médico Veterinário, Residência (R1) em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Mestre em Fisiologia, Doutorando pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Professor Substituto de Clínica de Pequenos Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). E-mail: gomespoppl@hotmail.com

Gabriela Garcia Araujo - Médica Veterinária Autonoma.

Pöppl AG, Araujo GG. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação; 2010; 8(27); 704-713.

Resumo

A diabetes mellitus canina é uma das doenças endócrinas mais comuns na prática veterinária. As fêmeas são mais acometidas do que os machos, sendo que a incidência da doença é maior durante o diestro, ficando claras as evidencias de que o diabetes mellitus em fêmeas caninas assemelha-se ao diabetes mellitus gestacional humano. Classicamente considera-se que as fêmeas são mais predispostas à diabetes em decorrência dos efeitos da progesterona e do hormônio do crescimento liberado pela glândula mamária em resposta a progesterona durante o diestro. Contudo, uma série de evidências vem demonstrando que outros fenômenos estão associados à resistência à insulina em cadelas durante o diestro, e que fatores moleculares, nutricionais, genéticos e auto-imunes também estão associados.

Palavras-chave: resistência à insulina, ciclo estral, cadelas, diabetes gestacional.

Abstract

Canine diabetes mellitus is one of the most commom endocrine diseases in veterinary practice. Female dogs are more prone to diabetes development, and the incidence is greater during diestrus, making clear that diabetes mellitus in female dogs are quite similar to gestational diabetes mellitus in humans. The classical explanation for female dog's suscetibility to diabetes involves the effects of progesterone and progesterone induced GH secretion by mammary gland during diestrus. However, many evidences have been shown that other issues are associated to insulin resistance during diestrus, and that molecular, nutritional, genetics and autoimmune factors are also implicated.

Keywords: insulin resistance, estrus cycle, bitches, gestational diabetes.

APÊNDICE III

ARTICLE IN PRESS

Research in Veterinary Science xxx (2012) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Diabetes mellitus remission after resolution of inflammatory and progesterone-related conditions in bitches

A.G. Pöppl [a,*], T.S. Mottin [b], F.H.D. González [c]

[a] Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, Brazil
[b] Hospital de Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, Brazil
[c] Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 February 2012
Accepted 15 October 2012
Available online xxxx

Keywords:
Insulin resistance
Diestrus
Gestational diabetes
Pyometra

ABSTRACT

Canine diabetes mellitus (CDM) remission is a rare event that is possible after the resolution of insulin resistance conditions, especially those related to the estrus cycle. A retrospective study was carried out at the Division of Veterinary Endocrinology from 2006 to 2011 to assess CDM remission rates after the resolution of problems associated with ovarian activity. Out of 117 female dogs diagnosed with CDM, six diabetes remission cases were identified and described after resolution of diestrus (1), or after ovariohysterectomy for pregnancy (1), ovarian remnant syndrome (1), and pyometra (3), even after initial presentation in severe diabetic ketosis or long after diagnosis (ovariohysterectomy was performed from 3 to 81 days after diagnosis, and diabetes resolution was achieved within 4–39 days after gonadectomy). Several factors may lead to diabetes remission. However, in these cases, ovariohysterectomy was crucial for the restoration of normal blood glucose levels, suggesting that diabetic bitches be spayed independently of the length of time after diagnosis.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

One of the subtypes of canine diabetes mellitus (CDM) in bitches can be compared to gestational diabetes mellitus (GDM) in humans, characterizing a subtype of insulin-resistant diabetes mellitus (IRD) (Catchpole et al., 2005; Fall et al., 2007). Since the 1950s, development of diabetes shortly after estrus has been well recognized in bitches and ovariohysterectomy (OHE) has been recommended as radical treatment of CDM (Campbell, 1958; Wilkinson, 1960). In the 1960s, Krook et al. (1960) first correlated CDM with pyometra, another typical condition associated with diestrus (Noakes et al., 2001) characterized by purulent fluid collection within the uterus with variable amounts of inflammatory cells in the uterine wall, that may or may not be preceded by cystic endometrial hyperplasia (Feldman and Nelson, 2004). Although insulin resistance mediated by progesterone is well characterized (Scaramal et al., 1997; Connolly et al., 2004; Batista et al., 2005), there is a paucity of case reports correlating CDM with diestrus, and mainly on its remission after spaying (Fall et al., 2008, 2010).

Moreover, although Fall et al. (2010) described a diagnostic prevalence of 17% for pyometra in females with concomitant CDM during diestrus, to our knowledge, there is no case report on the remission of diabetes after the resolution of the cystic endometrial hyperplasia–pyometra (CEH–P) complex, a condition associated with more severe insulin resistance due to the hormonal profile during diestrus and also to the septic/inflammatory process (Pöppl et al., 2009). The aim of this study was to investigate CDM remission after the resolution of clinical conditions associated with ovarian luteal activity.

A retrospective study was carried out by analyzing medical records of patients treated at the Division of Veterinary Endocrinology between 2006 and 2011, searching for female dogs diagnosed with remission of CDM after resolution of clinical situations related to ovarian luteal activity. The criteria used to confirm the diagnosis of CDM were clinical signs, especially polyuria and polydipsia, as well as persistent glucosuria and hyperglycemia (>200 mg/dL). The criteria used to define the remission of CDM were maintenance of normal blood glucose levels after discontinuation of insulin therapy, often defined after recurrent hypoglycemia, even after successive reductions in insulin dose. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of our University (CEUA/18.336).

Out of 117 female dogs diagnosed with CDM (patients with concomitant hyperadrenocorticism or hypothyroidism were not included), 72 (62%) had not been spayed at diagnosis, and from those, 35 (30%) were diagnosed during the diestrus phase of the estrus cycle. From those 72 intact bitches, 57 (79%) were spayed after CDM diagnosis. Six patients, with mean age of 8.5 years (range of 6–12 years), met the criteria for remission of CDM, after

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33088033; fax: +55 51 33086112.
E-mail address: gomespoppl@hotmail.com (A.G. Pöppl).

0034-5288/$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.008

Please cite this article in press as: Pöppl, A.G., et al. Diabetes mellitus remission after resolution of inflammatory and progesterone-related conditions in bitches. Res. Vet. Sci. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.008

APÊNDICE IV

Elsevier Editorial System(tm) for Research in Veterinary Science
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Analytic accuracy of risk factors for canine diabetes mellitus and survival after its diagnosis

Article Type: Research Paper

Section/Category: Endocrinology

Keywords: overweight, unbalanced diet, diestrus, pancreatitis, questionnaire

Corresponding Author: Dr. Alan Gomes Pöppl, DVM., MSc.

Corresponding Author's Institution: UFRGS, Faculty of Veterinary

First Author: Alan Gomes Pöppl, DVM., MSc.

Order of Authors: Alan Gomes Pöppl, DVM., MSc.; Bruna Meyrer, DVM; Heber Hein; Luis G Corbellini, DVM., MSc., PhD.; Félix D González, DVM., MSc., PhD.

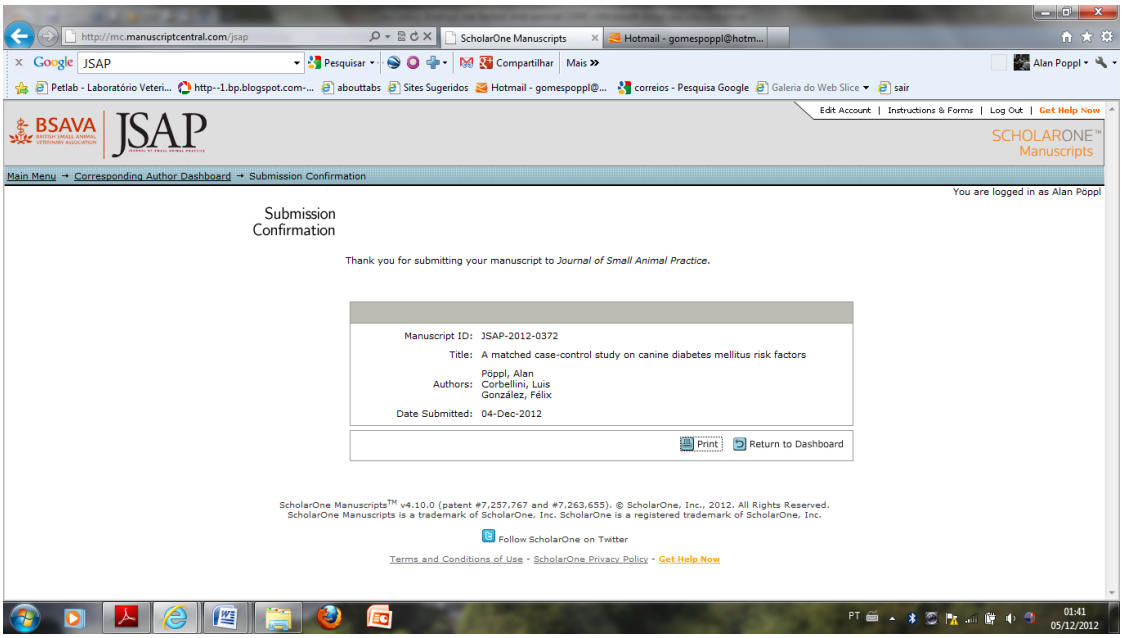
Abstract: Many risk factors have been described for canine diabetes mellitus (CDM) development. A questionnaire to evaluate exposure to risk factors for CDM and survival after its diagnosis was developed and applied to diabetic dogs owners. To determine sensitivity, specificity, and kappa coefficient, answers were compared with standardized medical records of the patient's first veterinary visit. There was a mean level of agreement per question of 95% (65-100%), with all kappa values ($P < 0.05$) greater than 0.81, except for questions that evaluated overweight (0.57) and diestrus (0.38), with a mean level of agreement per questionnaire of 92% (72 to 100%). Mean survival time of dead patients was 24.4 months (1-120 months). High exposure to unbalanced diet (70.9%), overweight (76.3%), diestrus (68%) and pancreatitis (20%) before diagnosis were identified. The questionnaire was assumed as a reliable tool in evaluating exposure to risk factors for the development of CDM.

Suggested Reviewers: Marcia M Jericó DVM., MSc., PhD
President, Brazilian Association of Veterinary Endocrinology
marciajerico@hotmail.com
Expertise in metabolic diseases, obesity, diabetes mellitus and also epidemiologic studies in Brazil

Jackeline Rand DVM., PhD.
Professor, Centre for Companion Animal Health, The Univesity of Queensland
j.rand@uq.edu.au
Expertise in diabetes mellitus and the impact of obesity and nutrition on insulin sensitivity

Alexander J German DVM., PhD.
Obesity and Endocrinology, University of Liverpool
ajgerman@liv.ac.uk
Expertise in nutrition, obesity and insulin resistance

APÊNDICE V



http://mc.manuscriptcentral.com/jsap

ScholarOne Manuscripts | Hotmail - gomespoppl@hotm...

Google JSAP | Pesquisar | Compartilhar | Mais » | Alan Poppl

Petlab - Laboratório Veteri... | http--1.bp.blogspot.com-... | abouttabs | Sites Sugeridos | Hotmail - gomespoppl@... | correios - Pesquisa Google | Galeria do Web Slice | sair

BSAVA | JSAP

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | Get Help Now

SCHOLARONE™ Manuscripts

Main Menu → Corresponding Author Dashboard → Submission Confirmation

You are logged in as Alan Pöppl

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Small Animal Practice*.

Manuscript ID:	JSAP-2012-0372
Title:	A matched case-control study on canine diabetes mellitus risk factors
Authors:	Pöppl, Alan Corbellini, Luis González, Félix
Date Submitted:	04-Dec-2012

Print | Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.10.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

Terms and Conditions of Use - ScholarOne Privacy Policy - Get Help Now

PT 01:41 05/12/2012