

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

SUSCETIBILIDADE A DIABETES MELLITUS EM CÃES OBESOS

ANGELA PATRICIA MEDEIROS VEIGA

PORTO ALEGRE

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

SUSCETIBILIDADE A DIABETES MELLITUS EM CÃES OBESOS

Autor: ANGELA PATRICIA MEDEIROS VEIGA

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

Orientador: Félix Hilario Díaz González

PORTO ALEGRE

2007

V426s Veiga, Angela Patricia Medeiros

Suscetibilidade a diabetes mellitus em cães obesos./ Angela

Patricia Medeiros Veiga - Porto Alegre: UFRGS, 2007.

90 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2007. Félix Hilário Díaz González, Orient.

1. Diabetes mellitus: veterinária: cães 2. Obesidade: veterinária: cães 3. Insulina: uso terapêutico: cães I. Diaz-González, Félix Hilário, Orient. II. Título

CDD 612.015

Catologação na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Angela Patricia Medeiros Veiga

SUSCETIBILIDADE A DIABETES MELLITUS EM CÃES OBESOS

Aprovada em 18 de Dezembro de 2007

APROVADO POR:

Prof. Dr. Félix Hilario Díaz González
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski
Membro da Comissão

Prof^ª Dr^ª Sonia Terezinha dos Anjos Lopes
Membro da Comissão

Prof^ª Dr^ª Kátia Padilha Barreto
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e fortalecer.

A meus pais e familiares, pelo apoio e compreensão incondicionais.

Ao Valério, por nunca desistir e fazer com que eu nunca desistisse, pela amizade e amor.

Ao meu orientador, Prof. Félix González, pela oportunidade e amizade.

Ao Prof. Christopher Alan Price, pela colaboração e supervisão durante o estágio no Canadá e pelos ensinamentos. Aos amigos do CRRRA pela ajuda científica e pessoal.

Às colegas de laboratório, Simone, Andréa, Vanessa, Luciana e Patrícia, pela ajuda durante os experimentos e pela parceria.

Ao colega Rômulo Campos por compartilhar de suas experiências pessoais e pela ajuda nas análises dos dados.

Aos residentes, professores e funcionários da UFRGS que colaboraram direta ou indiretamente com esta pesquisa.

À minha irmã Rita, pelo apoio e ajuda na correção do texto.

A Helica Biosystems, na pessoa de Wondu Wolde-Mariam, pelo suporte financeiro e auxílio técnico.

Ao CNPq e Waltham Foundation pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

O Sexo da *Diabete**

O gênero das doenças
É uma coisa muito rica
Pra isso entram as crenças
E o contexto a que se aplica

Já deu muita controvérsia
Peleia de especialista
Eu fico na minha inércia
Analisando os pontos de vista

Mas agora preciso muito
Saber o certo e o errado
Desta vez tenho o intuito
De defender um doutorado

O sexo da *Diabete*
Já está me incomodando
Meu orientador que repete
Está quase enfartando!

Por mim, seja hermafrodita
Pra não dar complicação
Não ligo se é fêmea, a bendita
Só quero uma decisão

Eu escolho o feminino
Deixando o chefe feliz
E acabamos este hino,
Pois já estamos por um triz!

* Termo utilizado propositadamente na forma errônea como liberdade poética.

Uma ode à Fru(c)tosamina

Vou começar a minha tese
Com uma dúvida fatal:
É “fructosamina” ou “frutosamina”
Que se escreve, afinal?

Como um bom colombiano
Meu chefe com “c” escreve
Mas pra saber a verdade
Façamos uma pesquisa breve

A gente costuma copiar
Tudo do velho inglês
Dessa vez vamos tentar
Falar as coisas em português??

Frutose, fruta, frutinha
Todos eles sem o “c”
Assim quero o meu conceito.
Pelo menos um A ou B...

Vamos logo ao que interessa
Esquecendo a ortografia
Em seguida os resultados
Da boa e velha Patologia!

SUSCETIBILIDADE A DIABETES MELLITUS EM CÃES OBESOS

Autor: Angela Patricia Medeiros Veiga

Orientador: Félix Hilario Díaz González

RESUMO

A obesidade vem aumentando progressivamente na população canina em decorrência de distúrbios endócrinos, alimentares e de manejo, o que leva ao aparecimento de doenças a ela relacionadas, sendo a Diabetes Mellitus a mais comum. Esta enfermidade ocorre devido a alterações na secreção ou sinalização da insulina em tecidos periféricos, gerando uma resistência periférica à insulina, o que pode levar à completa exaustão beta-pancreática, processo irreversível e incompatível com a vida. Pouco se sabe sobre a patogênese da resistência à insulina causada pela obesidade em cães. A proteína C reativa está relacionada à obesidade em humanos e roedores, mas não existem dados na literatura sobre a sua relação com a obesidade e resistência à insulina em cães. O transportador de glicose GLUT4 tem importante função na entrada de glicose nas células adiposas e musculares. A alteração na expressão desta proteína já foi associada à obesidade em várias espécies, incluindo cães, porém não se sabe se esta alteração está relacionada à resistência à insulina. O objetivo deste trabalho foi elucidar alguns aspectos bioquímicos e moleculares que cercam a resistência à insulina induzida pela obesidade em cães e com isso gerar subsídios para a prevenção da diabetes mellitus na espécie canina. Para tanto, foram realizados três experimentos, onde os dois primeiros tentaram elucidar aspectos bioquímicos da obesidade (efeito sobre os níveis de proteína C-reativa) e resistência à insulina (efeito sobre os níveis de fructosamina), e o último tentou avaliar aspectos moleculares em tecido adiposo e muscular (efeito sobre a expressão de GLUT4). Os resultados mostraram que a proteína C-reativa não se altera com a obesidade canina, e que a fructosamina altera-se com o desenvolvimento da resistência à insulina em cães. Uma modificação no padrão expressão da proteína GLUT4 entre os tecidos muscular e adiposo foi observada na presença da resistência à insulina e uma alteração na translocação foi verificada nos dois tecidos, causada pela obesidade. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a patogênese da resistência à insulina causada pela obesidade não é similar a outras espécies, e deve ser prevenida com medidas distintas. O presente estudo também gerou informações que podem auxiliar no diagnóstico e prevenção da resistência à insulina e diabetes mellitus na espécie canina.

Palavras-chave: metabolismo, caninos, pâncreas, insulina.

Susceptibility to diabetes mellitus in obese dogs

Author: Angela Patricia Medeiros Veiga

Advisor: Félix Hilario Díaz González

ABSTRACT

Obesity has been progressively increasing in canine population due to endocrine, nutritional and management disturbances, what leads to the appearance of related diseases, being Diabetes Mellitus the most common. This illness occurs because of insulin secretion or signaling alterations, generating a peripheral insulin resistance, what can lead to a complete beta-pancreatic exhaustion that is considered an irreversible and life-incompatible process. Little is known about pathogenesis of insulin resistance caused by obesity in dogs. C-reactive protein is related to obesity in human and rodent species, but there is no data in the literature about its relation with obesity and insulin resistance in dogs. GLUT4 glucose transporter has an important role on adipose and muscular cells glucose uptake. Alterations on GLUT4 protein expression have been established in obesity in some species including dogs, but there is no knowledge about this mechanism in insulin resistance in canine species. The aim of this work was to elucidate some biochemical and molecular issues surrounding obesity induced insulin resistance in dogs and thus generate information leading to prevention of diabetes mellitus in canine species. To achieve that, three experiments were accomplished, where the first two tried to elucidate biochemical aspects of obesity (effect on C-reactive protein levels) and insulin resistance (effect on fructosamine levels), and the third attempted to evaluate molecular aspects in fat and muscular tissues (effect on GLUT4 expression). Results showed that C-reactive protein levels do not alter with canine obesity, and that fructosamine levels change with the onset of insulin resistance. A modification on GLUT4 protein expression pattern between adipose and muscular tissues was observed in the presence of insulin resistance and a translocational alteration was detected in both tissues, caused by obesity. Based on the obtained results it can be postulated that the pathogenesis of insulin resistance caused by obesity differs from other species, and must be prevented with distinct measures. Furthermore, the present study generated information that can help on diagnosis and prevention of insulin resistance and diabetes mellitus in canine species.

Key-words: *metabolism, canine, pancreas, insulin.*

LISTA DE FIGURAS

	Página
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Figura 1. Escore de condição corporal sugerido por Laflamme (1997).....	23
 ARTIGO 1	
Figure 1. Variability chart for triglycerides and CRP in control and obese dogs. Horizontal bars show ranges (maximum, median, and minimum quantiles).....	42
Figure 2. Percentage of obese animals with high and physiological levels of triglycerides (top) and insulin (bottom).....	43
 ARTIGO 2	
Figura 1. Correlação entre níveis de fructosamina e relação I/G em cães obesos e controles (r=0,4; p=0,039).....	54
Figura 2. Correlação entre níveis de fructosamina e glicose pós-prandial em cães obesos e controles (r=0,4385; p=0,0196).....	55
 ARTIGO 3	
Figure 1. Mean (\pm SEM) serum glucose concentrations during intravenous glucose tolerance test (IVGGT) in control and obese dogs (*p<0.05).....	72

Figure 2. Mean (\pm SEM) serum insulin concentration during intravenous glucose tolerance test (IVGGT) in control and obese dogs (*$p < 0.05$).....	73
Figure 3. White adipose tissue mean content of GLUT4 protein in plasma membrane (PM) and microsomal fraction (MF) of obese and control dogs (*$p < 0.05$).....	74
Figure 4. Skeletal muscle mean content of GLUT4 protein in plasma membrane (PM) and microsomal fraction (MF) of obese and control dogs (*$p < 0.05$).....	75
Figure 5. Plasma membrane (PM) and microsomal fraction (MF) mean content of GLUT4 protein in white adipose tissue (WAT) of obese and control dogs (*$p < 0.05$).....	76
Figure 6. Plasma membrane (PM) and microsomal fraction (MF) mean content of GLUT4 protein in skeletal muscle (SM) of obese and control dogs.....	77
Figure 7. White adipose tissue mean content of GLUT4 protein in control, insulin sensitive (IS) and insulin resistant (IR) obese dogs (*$p < 0.05$).....	78

LISTA DE TABELAS

	Página
ARTIGO 1	
Table 1. Mean, maximum, and minimum values of morphometric and clinical variables from control and obese dogs.....	41
ARTIGO 2	
Tabela 1. Médias, erros-padrão da média, valores máximos e mínimos das variáveis estudadas em cães controles, obesos sensíveis à insulina e obesos resistentes à insulina.....	53
ARTIGO 3	
Table 1. Results of blood analyses in control and obese dogs (mean \pm SEM).....	70
Table 2. Mean \pm SEM of GLUT4 translocation index in obese and control dogs.....	70
Table 3. Mean \pm SEM of the variables related to insulin sensitivity in control, insulin sensitive, and insulin resistant obese dogs.....	71
Table 4. GLUT4 translocation index (mean \pm SEM) in control, insulin sensitive, and insulin resistant obese dogs.....	71

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Pâncreas endócrino.....	20
3.1.1 Insulina.....	21
3.2 Obesidade.....	22
3.3 Indicadores metabólicos e sanguíneos.....	25
3.4 Resistência à insulina.....	27
3.5 Transportadores de glicose (GLUT4).....	29
4 RESULTADOS.....	31
4.1 ARTIGO 1.....	32
4.1.1 Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein.....	32
4.1.2 ABSTRACT.....	32
4.1.3 INTRODUCTION.....	33
4.1.4 MATERIAL AND METHODS.....	33
4.1.5 RESULTS AND DISCUSSION.....	34
4.1.6 CONCLUSION.....	36
4.1.7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	36
4.1.8 SOURCES OF MANUFACTURERS.....	37
4.1.9 REFERENCES.....	37

4.2 ARTIGO 2.....	44
4.2.1 A fructosamina como uma ferramenta na avaliação da resistência à insulina em cães obesos.....	44
4.2.2 RESUMO.....	44
4.2.3 ABSTRACT.....	45
4.2.4 INTRODUÇÃO.....	46
4.2.5 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.2.6 RESULTADOS.....	47
4.2.6.1 Glicemia basal.....	47
4.2.6.2 Insulinemia basal.....	48
4.2.6.3 Fructosaminemia.....	48
4.2.6.4 Relação insulina/glicose.....	48
4.2.6.5 Glicemia pós-prandial.....	48
4.2.6.6 Trigliceridemia.....	48
4.2.7 DISCUSSÃO.....	49
4.2.8 CONCLUSÃO.....	50
4.2.9 AGRADECIMENTOS.....	51
4.2.10 REFERÊNCIAS.....	51
4.3 ARTIGO 3.....	56
4.3.1 White adipose and muscular tissue insulin signaling in insulin- resistant obese dogs: differential GLUT4 translocation pattern.....	56
4.3.2 INTRODUCTION.....	56
4.3.3 MATERIAL AND METHODS.....	57
4.3.3.1 Animals and collection.....	57
4.3.3.2 Blood and urine analysis.....	5
4.3.3.3 Cell fractionation and Western Blotting.....	59
4.3.3.4 Statistical analysis.....	60
4.3.4 RESULTS.....	61
4.3.4.1 Control versus obese dogs.....	61
4.3.4.2 Comparison between insulin sensitive and insulin resistant	

obese dogs.....	62
4.3.5 DISCUSSION.....	62
4.3.6 CONCLUSION.....	64
4.3.7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	65
4.3.8 SUMMARY.....	66
4.3.9 REFERENCES.....	67
5 DISCUSSÃO GERAL.....	79
6 CONCLUSÕES.....	82
7 REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....	83
ANEXO 1.....	88
ANEXO 2.....	89
ANEXO 3.....	90

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, grandes mudanças tem havido quanto ao manejo de caninos por seus proprietários. Diferente do que acontecia no passado, onde a população canina vivia livre na natureza e ingeria pequenas presas, com o passar do tempo e com a domesticação destes animais, eles passaram a conviver diretamente com seus proprietários e adquiriram hábitos humanos, principalmente no que diz respeito à alimentação. Anteriormente ingerindo basicamente proteínas e gorduras, levando uma vida altamente ativa ao caçar suas presas e sob efeito de hormônios reprodutivos endógenos, a população canina dificilmente era acometida pela obesidade. Atualmente os caninos habitam o interior de casas ou apartamentos, com pouco acesso ao exterior e ingerem uma dieta rica em carboidratos. Além disso, com o advento de programas de controle reprodutivo, o que evitou certos incômodos a seus proprietários, os caninos tornaram-se sedentários em virtude da ausência de tais hormônios na circulação, assim diminuindo os gastos energéticos.

Com o desenvolvimento sócio-econômico, a vida humana tornou-se mais atribulada e fundamentalmente os proprietários dos animais viram-se sem tempo de dispensar aos seus animais a merecida atenção, surgindo a culpa por deixá-los sozinhos. Como prêmio à vida solitária de seus animais, muitos proprietários costumam fornecer-lhes petiscos ricos em carboidratos, o que culmina também com o desenvolvimento da obesidade. Com o advento da indústria *pet* tornou-se comum alimentar os animais com rações específicas para a categoria, porém para a produção de tais rações na forma extrusada é necessária a adição de altos níveis de carboidratos simples na fórmula, levando a uma incorporação deste componente em níveis maiores do que o preconizado como ideal para a espécie. O fato de os proprietários fornecerem a seus cães uma grande quantidade de alimento altamente palatável apenas uma ou duas vezes por dia também colabora para a redução nas taxas metabólicas e desequilíbrio nos mecanismos fisiológicos que controlariam o balanço entre apetite e saciedade, estimulando, mais uma vez o desenvolvimento da obesidade.

A incorporação de altos níveis de carboidratos na dieta e o surgimento da obesidade levam a um desequilíbrio boidratos na .39 i64948 Tw[tabópb4 Tcla,

prazo, pode aumentar a suscetibilidade a diabetes mellitus. Este tem sido o tema de estudo de pesquisas recentes, porém poucas com a espécie canina como modelo experimental e a maioria utilizando animais induzidos experimentalmente à obesidade. Animais cuja obesidade foi naturalmente adquirida provavelmente apresentem diferenças metabólicas e celulares, o que se assemelha mais ao que ocorre na realidade clínica. Assim, fica clara a importância de se investigar a suscetibilidade destes animais a diabetes mellitus e elucidar alguns aspectos pouco conhecidos acerca da patogenia da resistência à insulina induzida pela obesidade naturalmente adquirida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a suscetibilidade de cães naturalmente obesos no desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes mellitus e determinar a quais alterações bioquímicas e celulares está relacionada tal suscetibilidade.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar as curvas glicêmica e de insulina em cães obesos, gerando informações para futuras investigações clínicas;

Determinar a concentração sérica da proteína C-reativa na obesidade de ocorrência natural em cães;

Verificar que alterações bioquímicas estão relacionadas à obesidade naturalmente adquirida em cães;

Verificar o efeito da obesidade e resistência à insulina sobre a expressão e translocação de transportadores de glicose (GLUT4) nos tecidos adiposo e muscular de cães obesos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A obesidade caracteriza um fenômeno de desnutrição, sendo definida como um acúmulo de gordura em excesso ao que seria necessário para a otimização das funções corporais, sendo prejudicial para a saúde e o bem-estar do ser-vivo (BUTTERWICK, 2000). Esta condição, na espécie humana, vem mostrando um crescimento acelerado e preocupante. Da mesma forma o faz a obesidade em animais de companhia, em consequência da sobrecarga do fornecimento de carboidratos e gorduras, castração, sedentarismo e resistência à insulina (MAZZAFERRO et al., 2003), o que aumenta a suscetibilidade a várias enfermidades. Trata-se da desordem nutricional mais comum em cães de nações desenvolvidas (ROBERTSON, 2003), apesar de fatores genéticos, sociais, culturais, metabólicos e endócrinos estarem associados (CARCIOFI et al., 2005).

Em condições normais, os animais controlam a quantidade de alimento ingerido, mas em consequência da alta palatabilidade e do desbalanço dos alimentos comerciais, a grande maioria dos animais ingere uma maior quantidade de alimento em relação ao que seria necessário para as condições de manutenção (BUTTERWICK, 2000).

Pesquisas mostram que 25,2% (ROBERTSON, 2003) a 40% (SAAD, 2004) dos cães apresentam sobrepeso (10-20% do peso ideal), percentual que pode chegar a 75% com o avanço da idade. Esta taxa incerta demonstra a dificuldade de reconhecimento da condição e, em especial, sobre as formas de avaliá-la.

A principal preocupação quando se menciona obesidade é a diabetes mellitus, enfermidade cuja incidência vem aumentando muito na clínica de pequenos animais nas últimas décadas. Trata-se da doença endócrina de maior incidência na clínica de pequenos animais, alcançando um percentual de 25% (PÖPPL & GONZÁLEZ, 2005).

O aumento na incidência desta patologia endócrina pode estar associado à obesidade e também ao mau uso de práticas nutricionais. Em gatos, a obesidade é o principal fator na etiologia da resistência à insulina (NELSON & COUTO, 1994). Ainda não foi comprovado que a obesidade em cães possa progredir à diabetes mellitus,

embora esteja claro que ela determine profundas mudanças na disponibilidade de glicose e secreção de insulina (HOENIG, 2002).

Cães e gatos, além de divergentes física e morfológicamente, também o são em termos metabólicos, requerendo níveis diferenciados de proteínas, gorduras e carboidratos alimentares (MASKELL & GRAHAM, 1994). Um manejo errado entre estes nutrientes pode causar sérios distúrbios metabólicos, dentre os quais a diabetes mellitus ocorre freqüentemente.

3.1 Pâncreas endócrino

O pâncreas é uma glândula com atividade exócrina, através da produção e secreção de enzimas digestivas; e endócrina, através da síntese e secreção de hormônios. Esta última função é exercida por agrupamentos de células diferenciadas, chamados Ilhotas de Langerhans, que secretam diversos tipos de substâncias, a saber (CINGOLANI et al., 2004):

1- Insulina: responde à maior parte da secreção pancreática endócrina, o que corresponde a 60% da secreção, sendo sintetizada pelas células β ou B pancreáticas, as quais ocupam a porção central das Ilhotas. O hormônio tem função principal no controle da glicemia, com caráter hipoglicemiante, sendo secretada fisiologicamente em situações de hiperglicemia.

2- Glucagon: produzido pelas células α ou A, que ocupam a periferia e o contorno dos capilares pancreáticos, atua conjunta e antagonicamente com a insulina no controle da glicemia. Responde a 25% da secreção pancreática.

3- Somatostatina: secretada pelas células δ ou D pancreáticas, respondem a 10% da secreção. Estas células apresentam estreita relação com as células β na sua localização, sendo 20 vezes mais numerosas no neonato do que no adulto. Sua função é inibir as demais secreções pancreáticas.

4- Polipeptídeo pancreático: secretado pelas células PP, também encontradas rodeando os capilares e na periferia das ilhotas, porém mais profundamente que as células A e D, responde apenas a 5% da secreção, atuando de forma regulatória após a alimentação e causando redução no apetite.

3.1.1 Insulina

A insulina constitui-se em uma molécula formada por duas cadeias polipeptídicas (A e B) ligadas por duas pontes dissulfeto. Tanto a seqüência de aminoácidos que compõem as cadeias como a estrutura tridimensional são altamente estáveis, as variações entre espécies ocorrendo ao nível da região carboxi-terminal da cadeia B, sendo esta região responsável pelas respostas antigênicas induzidas pela insulina. Em solução, formam-se facilmente agregados, sendo o hormônio encontrado na forma hexamérica no interior de grânulos dentro da célula onde é sintetizado e armazenado (SIBERNAGL & DESPOPOULOS, 2003).

A síntese de insulina ocorre no retículo endoplasmático rugoso das células, a partir da pré-pró-insulina que, ao direcionar-se ao complexo de Golgi é convertida em pró-insulina. A partir da atuação de enzimas – endopeptidase e exopeptidase – ocorre a clivagem da molécula em insulina e peptídeo C. A insulina é armazenada em grânulos, enquanto que o último, sem efeito biológico conhecido, sofre degradação hepática.

Para a secreção insulínica é necessário que um estímulo, através do líquido extracelular, chegue às células pancreáticas e, dada a sua interação com a membrana plasmática, desencadeie uma série de sinais intracelulares, dos quais o aumento dos níveis intra-citoplasmáticos de cálcio é o principal. A partir da fosforilação de enzimas e componentes de organelas ocorre, em última instância, a exocitose dos grânulos, culminando com a atuação hormonal nos tecidos-alvo. O principal estímulo à secreção de insulina em cães é a glicose e em gatos, a arginina. Outras substâncias que estimulam a secreção de insulina são: aminoácidos, corpos cetônicos, ácidos graxos, hormônios gastrintestinais, catecolaminas, potássio, corticotrofina, glucagon, glicocorticóides, hormônios sexuais, hormônios tireoidianos, entre outros (GUYTON & HALL, 1998).

Uma vez no líquido extracelular, a insulina atinge as células alvo através da ligação com seu receptor. A internalização do complexo induz um sistema de transdução, que leva à mobilização e ativação dos transportadores da glicose (GLUT), ativação de enzimas que participam da síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas. Este sistema de transdução está envolvido no controle da expressão gênica, o que resulta na entrada de glicose na célula e fosforilação oxidativa, glicogênese, lipogênese e proteogênese.

Em conjunto com o glucagon, a insulina realiza uma regulação estreita na glicemia, a cada momento.

3.2 Obesidade

Considera-se que, para animais de estimação, um aumento maior do que 20% além do peso ideal corresponda à obesidade (SAAD, 2004). O ganho de peso ocorre quando a energia adquirida através da ingestão excede a energia gasta pelo organismo, o que pode ser resultado da ingestão exacerbada, atividade física reduzida, taxa metabólica diminuída ou utilização mais eficiente de nutrientes (MASKELL & GRAHAM, 1994). As causas da obesidade já foram bem documentadas, podendo ser de origem endócrina, farmacológica, genética e ambiental (BUTTERWICK, 2000). No desenvolvimento da obesidade juvenil, não só o tamanho dos adipócitos está alterado, mas também seu número, o qual permanece por toda a vida. Na obesidade adquirida do adulto, por outro lado, este efeito não se verifica, aumentando apenas o tamanho das células, o que torna o controle mais fácil (SAAD, 2004).

Pouco se conhece acerca da patogênese da obesidade. Duas linhas complementares de abordagem têm sido pesquisadas em torno dos avanços a respeito deste tema: uma linha onde se estudam eventos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao balanço energético e outra mais recente, envolvendo biologia molecular, onde se estudam os fatores que determinam tal balanço. Vários fatores que controlam a ingestão alimentar e o gasto energético já foram identificados, porém os papéis precisos de cada um ainda não são totalmente compreendidos (SIGULEM et al., 2000). Além disso, foi descoberto que os adipócitos não têm apenas o papel de armazenar triglicerídeos, mas eles apresentam uma função endócrina, participando de rotas metabólicas que resultam no estado obeso, função esta relacionada às várias moléculas secretadas por eles, dentre as quais se destaca o fator de necrose tumoral (TNF- α) (MILLER et al., 1998).

O animal obeso necessitará de maior aporte de insulina para se manter, o que, a médio e longo prazo, leva à exaustão das células β -pancreáticas. Além disso, a obesidade foi associada em cães (VARGAS et al., 2004) e gatos (BRENNAN et al., 2004) à diminuição da expressão na membrana plasmática do transportador GLUT4, ainda que humanos diabéticos não-insulino dependentes tenham demonstrado níveis do transportador normal a levemente reduzido (LIENHARD et al., 1992). Assim, parece plausível que o reconhecimento precoce da doença possa ajudar a impedir tal exaustão

pancreática (MAZZAFERRO et al., 2003), já que a resistência à insulina foi demonstrada em animais diabéticos, comparados aos normais (FELDHAHN et al., 1999), à semelhança do que ocorre em humanos. Mais importante foi o achado de que gatos magros com resistência à insulina apresentam maiores riscos de desenvolver intolerância à glicose ao ganhar peso (APPLETON et al., 2001), o que também poderia acontecer em caninos.

Existem raças caninas mais predispostas à obesidade, como, por exemplo, Labrador Retriever. De acordo com o sexo, a diabetes ocorre com maior frequência em cadelas do que em cães, em consequência da maior exposição das fêmeas à progesterona, hormônio implicado no desenvolvimento da doença, já que estimula a secreção do hormônio do crescimento, que é diabetogênico (APPLETON et al., 2001; HERRTAGE, 1998).

Dentre os métodos existentes para estimação da gordura corporal, o escore de condição corporal (ECC), aliado à pesagem, é considerado um bom método, considerando-se custos e praticidade, onde, através da palpação corporal dos animais, é realizada a avaliação de costelas, espinha dorsal, ossos pélvicos, quantidade de massa muscular e gordura na caixa torácica (MARTIN et al., 2006). De acordo com estes parâmetros, os animais são enquadrados em 5 categorias que variam de 1 a 9 (muito magro / magro / ideal / sobrepeso / obeso), sendo 1 o “muito magro” e 9 o “obeso”, de acordo com a figura abaixo (LAFLAMME, 1997). Mawby et al. (2004) compararam o ECC com a mensuração da absorvência por raios X (DEXA) e com a diluição com água pesada (D₂O), encontrando boa correlação. Outra forma de determinar o percentual de gordura foi desenvolvido (GERMAN et al., 2006) e consiste em um escore de 7 pontos, relacionados a um algoritmo que considera características corporais, sendo efetuado até mesmo por proprietários.



Fig. 1 – Escore de condição corporal sugerido por Laflamme (1997).

3.3 Indicadores metabólicos e sanguíneos

Já está bem estabelecido que a obesidade está associada a resistência à insulina, diabetes mellitus tipo II, hipertensão, hiperlipidemia e doenças cardiovasculares, todos caracterizando a síndrome metabólica, alteração ainda pouco estudada em cães (KIM et al., 2003). A avaliação da obesidade e da diabetes, portanto, trazem consigo a necessidade de se pesquisarem indicadores metabólicos. Com o desenvolvimento dos sinais clínicos da diabetes, quais sejam: poliúria, polidipsia, polifagia e emagrecimento, devido à dificuldade de transporte da glicose para o meio intracelular, surgem várias alterações hemato-bioquímicas.

A hiperglicemia de jejum persistente com glicosúria associada consiste na prova diagnóstica mais concreta, em se tratando de diabetes mellitus, porém as complicações da enfermidade levam a outras características metabólicas, como aumento sérico de corpos cetônicos pela estimulação da lipólise e, com isto, aumento sérico de colesterol, ácidos graxos livres (AGL) e triglicerídeos. Com a utilização aumentada de depósitos corporais de gordura, esta acaba se acumulando no fígado, que sofre degeneração gordurosa, aumentando a atividade sérica de enzimas hepáticas, principalmente ALP e ALT.

A presença de glicose no líquido extracelular por um período de 4 a 6 semanas leva à glicosilação não enzimática de proteínas, gerando cetaminas estáveis. Estas cetaminas, também chamadas de fructosaminas, aumentam proporcionalmente com o aumento de glicose plasmática naquele intervalo de tempo, refletindo o valor médio da glicemia neste período (STRYER, 1996). A quantificação da concentração de fructosamina sérica consiste em um parâmetro muito útil para monitorar a resposta à insulina em cães diabéticos (COMAZZI et al., 2002) e, apesar de não terem sido encontradas diferenças entre cães obesos e massivamente obesos quanto a tal proteína, 50% dos animais apresentam hiperfructosaminemia (MARTIN et al., 2006). Adicionalmente, não há estudos relacionando a utilização desta proteína na avaliação da resistência à insulina independente de diabetes em cães. Hipotiza-se que, assim como a curva glicêmica está alterada, os níveis séricos de fructosamina também estejam, em animais com reduzida sensibilidade à insulina. Estudos relacionaram o aumento dos valores de fructosamina em gatos diabéticos, comparados aos não-diabéticos, caracterizando a prova como altamente sensível e específica, principalmente na

diferenciação entre hiperglicemia transitória e diabética (PLIER et al., 1998), porém aumentos significativos não foram demonstrados em gatos obesos (HOENIG, 2002).

O hemograma não serve como prova diagnóstica para a diabetes, mas sim como um exame para avaliação do quadro clínico. O enriquecimento da membrana eritrocitária com colesterol leva à perda de elasticidade e posterior deformação da célula, o que resulta na formação de espículas (poiquilocitose), fragilidade e redução da meia-vida (JAIN, 1993). Porém, afora o maior número de plaquetas, Comazzi et al. (2002) não observaram nenhuma alteração nos parâmetros hematológicos ao comparar cães normais e diabéticos, concluindo que, diferente do que se encontra na literatura para felinos e humanos diabéticos, mínimas são as alterações nas funções eritrocitárias em cães sob insulino terapia. A presença de glicose nos tecidos pode estimular a proliferação de bactérias e o surgimento de infecções secundárias, o que leva a um leucograma inflamatório, com leucocitose e desvio à esquerda (MEYER & HARVEY, 1998).

Ainda que não seja caracterizada a diabetes, estudos comprovam que a obesidade consiste em uma condição inflamatória. O tecido adiposo não é formado apenas por adipócitos, mas também macrófagos, cujo número está relacionado à adiposidade e ao tamanho dos adipócitos (FANTUZZI et al., 2005). Assim, foi demonstrado em humanos e ratos obesos uma elevação nos níveis de proteína C-reativa, interleucina-6 (IL-6), TNF- α e leptina, conhecidos como mediadores inflamatórios (DAS, 2001). Níveis aumentados de TNF- α no tecido adiposo de caninos e felinos também foram associados à obesidade (MILLER et al., 1998; BLANCHARD et al., 2004), sustentando a obesidade como um evento inflamatório.

A proteína C-reativa (CRP) é uma proteína de fase aguda positiva secretada por hepatócitos após estimulação por mediadores pró-inflamatórios, principalmente IL-6, IL-1 e TNF- α , liberados por macrófagos e outras células em resposta a estímulos externos e internos (MURATA et al, 2004), ativando o sistema complemento, ligando-se a receptores Fc de células polimorfo e mononucleares, e atuando como opsonina para vários patógenos. A sua ligação a receptores Fc dessas células gera citocinas pró-inflamatórias, podendo esta molécula ser utilizada como marcador de inflamação (KANEKO et al., 1997). Vários autores associam o seu aumento no soro à obesidade humana (PARK et al., 2005; ZAGORSKI et al., 2005). Outros estudos relataram que a relação entre elevações nos níveis de CRP e resistência à insulina ocorre independente

da obesidade em humanos (McLAUGHLIN et al., 2002), porém ainda não foi estudado o papel desta proteína de fase aguda na obesidade canina.

O processo inflamatório está implicado na resistência à insulina que ocorre com o desenvolvimento da obesidade, mas ainda falta elucidar como esta relação se dá (FANTUZZI et al., 2005; MARCELL et al., 2005). Provavelmente a inflamação gerada altere a rota de transdução de sinais da insulina. Adicionalmente, TNF- α inibe a sinalização intracelular da tirosina quinase do receptor de insulina, reduzindo o transporte de glicose e colaborando para o desenvolvimento de resistência à insulina (MILLER et al., 1998).

Estudos mostram ambigüidade em relação aos efeitos da redução de peso sobre os níveis de CRP em humanos (MARCELL et al., 2005; ZAGORSKI et al., 2005). A avaliação dos níveis da CRP não só se prestou como uma previsão do risco do desenvolvimento da diabetes mellitus em humanos (SJOHÖLM & NYSTRÖM, 2005), como também seus níveis aumentaram à medida que as alterações ocorriam, antes mesmo de os sinais clínicos e as alterações hematológicas se desenvolverem, fazendo da CRP uma ferramenta de grande utilidade na avaliação da progressão da enfermidade (MURATA et al., 2004; PRADHAN et al., 2001). Por outro lado, estudos comprovam que tanto a insulina quanto os triglicerídeos exercem um efeito inibitório sobre a CRP (MARTÍNEZ-SUBIELA & CERÓN, 2005; DANDONA et al., 2007). Existe, portanto, uma dúvida quanto aos níveis sanguíneos de CRP em caninos obesos e insulino-resistentes.

A concentração intracelular elevada de ácidos graxos livres e seus metabólitos ativam rotas de transdução de sinais, que induzem inflamação e alteram a sinalização da insulina (KREBS & RODEN, 2004). Estudos revelaram dislipoproteinemias em cães obesos e resistentes à insulina, porém ainda não diabéticos (BAILHACHE et al., 2003). No estudo foi observado um aumento nos triglicerídeos séricos relacionado às lipoproteínas VLDL e HDL, o que foi associado à baixa resposta à insulina. Também foi observada redução nos níveis de HDL relacionado ao colesterol e aumento nos níveis séricos de ácidos graxos não-esterificados, o que é comum em humanos.

3.4 Resistência à insulina

À medida que os tecidos periféricos vão se tornando menos responsivos à insulina liberada de forma endógena, mais glicose vai sendo mantida no líquido extracelular, aumentando seus níveis sanguíneos. Devido à irresponsividade à insulina, a glicose não atinge o interior das células, sendo caracterizado um débito energético intracelular e o estímulo para liberação de insulina se mantém. Desta forma, a resistência periférica à insulina aumenta a suscetibilidade a diabetes mellitus, já que o estímulo constante à liberação de insulina pelo pâncreas poderá exaurir por completo as células até o desenvolvimento da enfermidade. Assim, a suscetibilidade a diabetes pode ser investigada por vários métodos, todos com seus prós e contras.

O teste de tolerância à glicose, tanto oral quanto intravenoso, cujos protocolos já foram mencionados por outros autores (NELSON & COUTO, 1994; MASKELL & GRAHAM, 1994; THIESS et al., 2004), é a forma mais comumente utilizada, aliando relativa facilidade de execução a bons resultados na avaliação. Com esta prova pode-se analisar a curva de utilização da glicose após a administração desta substância por via venosa ou oral. A área sob a curva (AUC) neste tipo de gráfico foi maior em felinos obesos do que em sadios (BRENNAN et al., 2004), mas não em caninos cuja obesidade foi induzida experimentalmente (KIM et al., 2003). A obesidade de ocorrência natural gera uma intolerância à glicose, o que poderia ser verificada através desse teste. Ainda que tenha sido verificada uma glicemia basal coerente com valores de referência descritos na literatura em cães obesos (FARIA et al., 2005), sabe-se que após a administração de glicose os níveis glicêmicos iniciais do animal obeso são maiores que os de animais normais e tais níveis nunca atingem a normalidade. Se esta curva for determinada previamente à exaustão -pancreática, o quadro pode ser revertido antes da instalação da diabetes. Além disso, com a curva glicêmica obtêm-se dados para diferenciar entre os quatro tipos de diabetes existentes, a saber: insulino-dependente; não insulino-dependente; induzida por antagonismo à insulina e transitória (FELDHAHN et al., 1999). A hipótese de a AUC glicêmica estar aumentada em cães naturalmente obesos pode gerar informações úteis na rotina clínica como um método de avaliação da obesidade e prevenção da diabetes mellitus.

Durante a execução do teste de tolerância à glicose costuma-se, paralelamente, realizar a dosagem seriada de insulina, o que gera mais dados para a

interpretação do quadro de suscetibilidade a diabetes mellitus. Em cães foi demonstrado aumento nas concentrações séricas de insulina endógena causado pela obesidade (BAILHACHE et al., 2003; KIM et al., 2003) enquanto que a diminuição foi verificada em cães diabéticos com ceto-acidose (PARSONS et al., 2002), o que sugere a progressão para a exaustão -celular em decorrência da obesidade. Porém não é conhecida a causa destas alterações. Estaria a liberação de insulina sendo estimulada em cães por uma alteração na translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana? Por outro lado, a quantificação de transportadores GLUT4 em membranas de tecidos adiposo e muscular de humanos diabéticos não insulino dependentes revelou-se normal ou levemente reduzida, o que gera controvérsias quanto ao mecanismo de ação de tal proteína no desenvolvimento da resistência à insulina (LIENHARD et al., 1992).

A utilização das curvas glicêmica e de insulina durante o teste de tolerância à glicose gera dados que podem ser empregados conjuntamente para a avaliação da suscetibilidade. A avaliação de valores basais de glicose e insulina, além de cálculos como a relação insulina/glicose de jejum, relação AUC (insulina) / AUC (glicose) e o índice HOMA foram caracterizados como auxiliares na investigação da resistência à insulina (MATTHEWS et al., 1985; FELDMAN & NELSON, 1996; VARGAS et al., 2004; APPLETON et al., 2005). Como valores de referência para a espécie canina, Feldman & Nelson (1996) citam para insulina 5-20 UI/mL e para relação insulina/glicose até 0,235.

Níveis elevados de ácidos graxos livres e seus metabólitos tanto no líquido extracelular como intracelular foram associados à resistência à insulina por ativarem rotas de transdução de sinais e induzirem inflamação endotelial (BAILHACHE et al., 2003; KREBS & RODEN, 2004; SJÖHOLM & NYSTRÖM, 2005), portanto auxiliando na avaliação da suscetibilidade a diabetes mellitus. Outras técnicas mais complexas e utilizadas, na sua grande maioria, experimentalmente, como o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (BAILHACHE et al., 2003a; GAYET et al., 2007), ou o teste intravenoso de tolerância à insulina (SERAPHIM et al., 2001) também servem para este fim. No entanto, tais técnicas são altamente invasivas e dispendiosas, algumas necessitando intervenções cirúrgicas, apesar de gerarem resultados mais precisos; assim, perdendo o cunho prático para a realização como um exame clínico.

3.5 Transportadores de glicose (GLUT4)

Para que a glicose possa ser transportada para o meio intracelular, primeiramente deve se ligar ao seu receptor específico. Ainda não se chegou a um acordo com relação a todas as alterações causadas pela obesidade, no que diz respeito à cascata de sinalização intracelular da insulina, principalmente na resistência à insulina e diabetes mellitus não-insulino-dependente. Sabe-se que a resistência à insulina que ocorre neste tipo da enfermidade se dá devido à perda numérica de receptores ou de afinidade entre eles e a insulina (ZERBÉ, 2001). Possivelmente haja uma alteração na rota de sinalização, o que pode envolver o receptor ou uma das proteínas ainda desconhecidas que traduzem o sinal dos receptos aos transportadores GLUT4 (LIENHARD et al., 1992). Pesquisas recentes revelaram que em cães obesos, há uma desregulação gênica pelo PPR envolvendo inibição na expressão de GLUT4 em músculo e tecido adiposo (GAYET et al., 2007).

A ligação da insulina a um receptor específico de membrana, principalmente de adipócitos, ativa a tirosina-quinase da subunidade do receptor, resultando na fosforilação de várias proteínas, incluindo os substratos do receptor de insulina (KREBS & RODEN, 2004). O IRS fosforilado em tirosina cria sítios de reconhecimento para algumas moléculas, incluindo a fosfatidilinositol 3-quinase [PI3-quinase] (CARVALHEIRA et al, 2002).

Após a ligação da insulina em seu receptor, é gerado um sistema de sinalização intracelular, alterando a conformação de proteínas de membranas ou intracelulares, fazendo com que a glicose presente no líquido extra-celular possa ingressar na célula. De acordo com o grau metabólico, cada tecido expressa um transportador específico, encontrando-se o GLUT4 nos tecidos muscular e adiposo (LIENHARD et al, 1992). A IP3-quinase foi implicada como um dos principais transdutores de sinais na entrada celular de glicose estimulada pela insulina e translocação de transportadores GLUT 4 para a membrana (RONDINONE et al, 1997). Sabe-se que tal translocação envolve a participação de componentes do citoesqueleto (LIENHARD et al., 1992), porém o mecanismo pelo qual ocorre até hoje não foi compreendido. Estudos recentes observaram uma diminuição na expressão gênica e protéica de transportadores GLUT 4 em animais obesos (VARGAS et al., 2004;

BRENNAN et al., 2004; GAYET et al., 2007), no entanto ainda não se estudou alterações na translocação desta proteína para a membrana em caninos e felinos.

Na maioria dos experimentos realizados, o efeito da insulina é estudado a partir da sua administração exógena. De acordo com Garvey et al. (1999), a insulina altera a localização sub-celular de vesículas de GLUT4 nas células musculares de indivíduos insulino-resistentes, tanto na presença quanto na ausência de diabetes. No modelo de obesidade estudado por Miura et al. (2001) em ratos, a insulina exógena estimulou a translocação de GLUT4 da fração microsomal para a membrana plasmática. Já que a resistência à insulina por si só leva a um aumento na secreção endógena de insulina, isto poderia ser suficiente para estimular a translocação da proteína para a membrana, porém se acontecesse, o metabolismo de glicose não se alteraria. Como esta informação não existe na literatura, há uma lacuna no entendimento da principal proteína celular responsável pela entrada de glicose nas células, quanto à resistência à insulina. Seraphim et al. (2001) compararam ratos obesos e magros, observando uma redução na expressão de GLUT4 no tecido muscular, mas não no tecido adiposo. Além disso, não verificaram mudanças no conteúdo de GLUT4 no tecido muscular de ratos obesos com o emagrecimento, gerando ainda mais controvérsias se realmente a resistência à insulina causada pela obesidade leva a tal alteração e se ambos os tecidos muscular e adiposo colaboram na mesma parcela na sinalização da insulina.

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são apresentados na forma de artigos científicos. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um dos artigos, com sua formatação de acordo com as orientações das revistas científicas às quais foram submetidos. Os comprovantes de submissão ou aceite encontram-se em anexo.

4.1 ARTIGO 1

4.1.1 Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein

Aceito para publicação no Journal of Veterinary Diagnostical Investigation (aceite em ANEXO 1). Publicação prevista para o volume 20, número 2, em março de 2008.

4.2 ARTIGO 2

4.2.1 A fructosamina como uma ferramenta na avaliação da resistência à insulina em cães obesos

Submetido a Ciência Rural (comprovante de submissão em ANEXO 2).

4.3 ARTIGO 3

4.3.1 White adipose and muscular tissue insulin signaling in insulin-resistant obese dogs: differential GLUT4 translocational pattern

Submetido ao Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (comprovante de submissão em ANEXO 3).

4.1 ARTIGO 1

4.1.1 Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein

4.1.2 ABSTRACT

The prevalence of obesity is increasing in dogs as well as in humans. C-reactive protein (CRP) is an important tool for the detection of inflammation and/or of early tissue damage and is also linked to obesity in humans. The objective of the present study was to determine if serum CRP levels are altered in obese dogs. Fifteen lean (control group) and 16 overweight (obese group) dogs were examined. Blood samples were collected under fasted conditions for serum determination of CRP, glucose, insulin, cholesterol, triglyceride, and fructosamine. Results indicated that obese dogs were insulin resistant, as serum insulin and insulin/glucose ratios were higher than in lean dogs ($p < 0.05$). Serum CRP concentrations were lower in obese dogs compared to controls ($p < 0.001$). CRP was negatively correlated with insulin/glucose ratio ($R = -0.42$) and cholesterol ($R = -0.39$; $p < 0.05$). Furthermore, levels of cholesterol, triglycerides and fructosamine were increased in obese group compared with control group. Based on these results, it can be postulated that CRP production is inhibited by obesity and insulin resistance in dogs.

Key words: Acute phase proteins; insulin resistance; dog.

4.1.3 INTRODUCTION

The prevalence of obesity has been progressively increasing in companion animals within the last 50 years³³, and with it there has been an increase in associated metabolic diseases including diabetes mellitus.^{8,10,12,13,15,30,31} Human obesity is considered to be an inflammatory condition because of increased production and release of proinflammatory mediators⁷ which are also accompanied by an increase in white blood cell (WBC) and lymphocyte counts in obese subjects.³⁶ This inflammatory response may be mediated in part by C-reactive protein (CRP).

CRP is a positive acute phase molecule secreted by the liver in response to internal and external injury.²⁶ CRP binds to Fc membrane receptors of neutrophils and mononuclear cells, and stimulates the release of proinflammatory cytokines.⁴ Interestingly, serum CRP levels are increased in obese humans^{7,25,28,37} and insulin reduces CRP levels in humans.⁶ However, the role of CRP in canine obesity remains to be studied. Carbohydrate metabolism differs between dogs and humans,³³ therefore results in humans may not be applicable to dogs. The objective of this experiment was to determine serum CRP levels in obese and overweight dogs and to determine the effect of insulin resistance on these parameters in obese dogs.

4.1.4 MATERIAL AND METHODS

Thirty-one owner-presented dogs of different breeds were used in this experiment. Before being accepted into the study, the general health of the animals was assessed by hemogram, platelet count, urinalysis, alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) isoenzyme test, blood urea nitrogen (BUN) test, and creatinine tests. Blood (5 mL) was collected into vacuum collection tubes^a with ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant for hemogram and platelet count. Whole blood count was made on a semiautomatic cell counter^b and the white cell differential count was performed using optical microscopy. Biochemical assays were performed using semi-automatic spectrophotometer^c with commercial kits.^d The animals were weighed and their 9-point body condition score (BCS) was verified.^{20,23} Fifteen dogs had scores of 3 to 5 and were considered to be lean (control group), and 16 dogs had scores of 7 to 9 and were considered obese. Twelve- to 16-hr fasting blood collection was performed

for serum determination of glucose (glucose-oxidase),^e insulin (radioimmunoassay [RIA]),^f CRP (enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]),^g triglycerides (glycerolphosphate-oxidase), cholesterol (cholesterol-oxidase), and fructosamine (nitroblue tetrazolium [NBT]).^{c,d} Insulin and CRP assays were performed with commercial kits according to the manufacturers' instructions. Insulin/glucose ratio was calculated as a measurement of insulin sensitivity.^{9,17,35} The study was approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Veterinary Hospital animal care committee and was performed under the principles set down by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Statistical analysis was performed using Statistical Analysis Software (SAS).^h The Mann-Whitney U-test was applied to non-parametric data to determine differences among groups, with a significance level of $p < 0.05$. Correlations were determined with Pearson's Correlation Test.

4.1.5 RESULTS AND DISCUSSION

Data are presented as means \pm standard error of mean (SEM), maximum and minimum values. Table 1 shows the morphometric and clinical variables for control and obese dogs. As for morphometric characteristics (weight and BCS), obese dogs showed higher values than controls. Obese dogs had lower serum CRP concentrations, and higher levels of insulin, insulin/glucose ratios, cholesterol, triglycerides, and fructosamine concentrations compared with lean dogs.

Mean values of insulin and insulin/glucose ratios were significantly higher in obese than in control dogs. This ratio is considered to be a good indicator of insulin resistance and also gives information regarding relative insulinemia.^{1,9,17} The limit value for the insulin/glucose ratio considered was 0.235.¹⁷ Thus, 56.3% of the obese animals had high concentrations of insulin and all had high values of insulin/glucose ratio.¹⁰ The high concentrations of triglycerides³⁰ in 62.5% of obese dogs indicate dislipidemia (versus controls). Although no change in cholesterol levels was detected considering reference range but for one animal, obese group showed higher levels than control group ($p < 0.0001$), which can indicate a trend to a long-term increasing. Fructosamine reflects the state of glycemia over the previous 2 to 3 weeks,^{3,5,32} therefore the increased fructosamine levels in obese dogs suggests that they had more episodes of higher

concentrations of glucose than controls throughout such a period. The reference range considered here for this metabolite was determined by the authors' laboratory,³⁰ which can be lower than the reference range reported in other studies^{5,21,32} and related to regional differences found in Southern Brazil compared to other countries.

Metabolic syndrome is reached with the development of at least three of the following characteristics: hypertension, hyperlipidemia, fat accumulation and insulin resistance.^{2,14,16,18} Although the obese dogs in this study were not yet diabetic or hyperglycemic, and their blood pressure was not determined, their fat accumulation, hypertriglyceridemia (in 62.5% of obese animals), hyperinsulinemia (in 56.3% of obese animals), and increased insulin/glucose ratio makes them strong candidates for metabolic syndrome (Fig. 2).

The concentrations of CRP in control dogs, which ranged from 0.6 to 8.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, are in general agreement with many studies,^{11,19,27,29} but disagree with others²⁴ that reported lower ranges for this protein in healthy dogs. Figure 1 shows the variability chart for CRP and triglycerides in both groups, where the points, range bars (which include maximum, median, and minimum quantiles) and cell means can be observed. Two animals of the control group showed higher levels of CRP, and probably this has been responsible for the high maximum values in this group compared to previous studies.²⁴ This high values could be suspected to be elevated as a response to inflammation. To exclude this possibility in the control dogs of the present experiment, we accessed WBC count and the control dogs fell within the reference range (8,900 to 17,500 cells per μL) for this parameter (Table 1). Control group included one animal whose WBC fell within the superior limit of reference range, (17,500 cells per μL), but interestingly its serum CRP concentration (1.9 $\text{mg}/\mu\text{L}$) was not the highest. Other two animals who showed the highest levels of CRP on the control group (7.7 and 8.8 $\text{mg}/\mu\text{L}$), did not show the highest WBC counts (9,600 and 10,700 cells per μL , respectively). Since CRP is considered to be more sensitive than the WBC count in the assessment of inflammation, this possibility was reasonably excluded with the absence of clinical signs of inflammation and / or infection. Additionally, serum CRP levels were lower in obese dogs, and there was a negative correlation ($R = -0.42$; $p < 0.01$) between the insulin/glucose ratio and CRP. These data are in contrast with those of humans, who show increased serum CRP levels with the onset of obesity.^{28,37} The decision to use insulin concentrations and insulin/glucose ratio for the assessment of insulin sensitivity was based in previous reports in dogs.^{9,17} Other techniques have been

used in the evaluation of the response to oral or venous administration of glucose^{1,2,16,21,34} but these are more expensive, time-consuming and invasive approaches, although more sensitive, than the use of basal insulin levels and the calculation of insulin/glucose ratio. Furthermore, no changes have been found in the rates of insulin stimulated glucose uptake in dogs affected by metabolic syndrome in previous studies.¹⁶

The effect of triglycerides on CRP concentrations has been demonstrated in recent studies.²² Since 62.5% of the obese dogs showed hypertriglyceridemia (Fig. 2), this would be expected to lower circulating CRP levels, as observed in the present study. As the dogs in the present experiment were not all hyperinsulinemic, it is likely that metabolic disease was not as advanced as that observed in studies in humans with insulin resistance. This is also supported by a study in which plasma CRP levels were elevated in obese women who were insulin-resistant but not in those who were insulin-sensitive.²⁵ As for CRP concentrations, the difference between studies may be related to the level of insulin-resistance.

4.1.6 CONCLUSION

Canine obesity and insulin resistance cause CRP levels to decrease. To the authors' knowledge, this is the first report of serum levels of CRP in obese dogs. The results are contrary to observations in human subjects, which suggest a metabolic difference between species. It is clear that species-specific data are necessary for the correct interpretation of clinical indicators of obesity/diabetes in companion animals. The mechanism by which CRP levels are decreased in obese dogs remains to be determined.

4.1.7 ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)–Brazil and the Waltham Foundation. The authors thank Helica Biosystems for the donation of kits for canine measurements of CRP.

4.1.8 SOURCES AND MANUFACTURERS

- a. Hemogard® K3, Labnew Indústria e Comércio LTDA, São Paulo, SP, Brazil.
- b. CELM 500–Cia, Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo, SP, Brazil.
- c. Metrolab 1600 Plus, Vis-Metrolab S.A., Buenos Aires, Argentina.
- d. Labtest Diagnostic S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil.
- e. Accu-Check® Active Blood Glucose Meter, Roche Diagnostics, São Paulo, SP, Brazil.
- f. Linco Research, Billerica, MA.
- g. Helica Biosystems, Inc., Fullerton, CA.
- h. SAS, Statistics Software v2, version 6.08, Cary, NC.

4.1.9 REFERENCES

1. Appleton DJ, Rand JS, Sunvold GD: 2005, Basal plasma insulin and homeostasis model assessment (HOMA) are indicators of insulin sensitivity in cats. *J Feline Med Surg* 7:183–193.
2. Bailhache E, Nguyen P, Krempf M, et al.: 2003, Lipoproteins abnormalities in obese and insulin-resistant dogs. *Metabolism* 52:559–564.
3. Bennet N: 2002, Monitoring techniques for diabetes mellitus in dogs and cats. *Clin Tech Small Anim Pract* 17: 65-69.
4. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, et al.: 1999, The major receptor of C-reactive protein on leukocyte is Fc γ receptor II. *J Exp Med* 190: 585–590.
5. Coppo JA, Coppo NB: 1997, Serum fructosamine: a reference interval for a heterogeneous canine population. *Vet Res Commun* 21: 471–476.
6. Dandona P, Chaudhuri A, Mohanty P, et al.: 2007, Anti-inflammatory effects of insulin. *Curr Opin Clin Nutr* 10:511–517.
7. Das UN: 2001, Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 17:953–963.
8. Faria PF, Araújo DF, Soto-Blanco B: 2005, Glicemia em cães obesos e senis [Glucemia in obese and elderly dogs]. *Acta Sci Vet* 33:47–50.
9. Feldman EC, Schall WD, Kruth SA: 1986, Amended insulin/glucose ratio. *J Am Vet Med Assoc* 188: 1227–1230

10. Feldman EC, Nelson RW: 1996, *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 2nd ed., pp. 422–441. Saunders, Philadelphia, PA.
11. Fransson BA, Karlstam E, Bergstrom A, et al.: 2004, C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 40: 391–399.
12. German AJ: 2006, The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr* 136: 1940S–1946S.
13. Hoenig, M: 2002, Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Mol Cell Endocrinol* 197:221–229.
14. Jesri A, Okonofera EC, Egan BM: 2005, Platelet and white blood cell counts are elevated in patients with metabolic syndrome. *J Clin Hypertens* 7:705–711.
15. Kaneko, JJ: 1997, *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th ed. Academic Press, New York. 932 p.
16. Kim SP, Elmerer M, Van Citters G, et al.: 2003, Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by isocaloric moderate-fat diet in the dog. *Diabetes* 52: 2453–2460.
17. Kogika MM, Brandão LP, Jericó MM, et al.: 2001, Determinação das concentrações séricas de glicose e insulina de cães em choque endotóxico [Evaluation of glucose and insulin serum concentration of dogs in endotoxic shock]. *Cienc Rural* 31: 813-817.
18. Krebs M, Roden M: 2004, Molecular mechanisms of lipid induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. *Diabetes Obes Metab* 7:621–632.
19. Kuribayashi T, Shimada T, Matsumoto M, et al.: 2003, Determination of C-reactive protein (CRP) in healthy Beagle dogs of various ages and pregnant Beagle dogs. *Exp Anim* 52: 387–390.
20. Laflamme DP: 1997, Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine practice* 22: 10-15.
21. Martin LJM, Siliart B, Dumon HJW, et al.: 2006, Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr* 90:355–360.
22. Martínez-Subiela S, Cerón JJ: 2005, Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirrubunemia, and anti-coagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A and ceruloplasmin assays. *Can Vet J* 46:625–629.
23. Mawby DI, Bartges JW, d'Avignon A, et al.: 2004, Comparison of various methods for estimating body fat in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 40: 109-114.

24. McGrotty YL, Knottenbelt CM, Ramsey IK, et al.: 2004, Evaluation of a rapid assay for canine C-reactive protein. *Vet Rec* 154: 175–178.
25. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, et al.: 2002, Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein. *Circulation* 106:2908–2912.
26. Murata H, Shimada N, Yoshioka M: 2004, Current research on ac

36. Womack J, Tien PC, Feldman J, et al.: 2007, Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism* 56:998–1004.
37. Zagorski SM, Papa NN, Chung MH: 2005, The effect of weight loss after gastric bypass on C-reactive protein levels. *Surg Obes Rel Dis* 1:81–85.

Table 1. Mean, maximum, and minimum values of morphometric and clinical variables from control and obese dogs.*

Variable	Control group	Obese group	P-value
Weight (kg)	13.1 ± 0.87 (9.1–20.3)	21.4 ± 2.93 (8–45.7)	<0.0001
BCS	4.57 ± 0.228 (3–5)	7.8 ± 0.262 (7–9)	0.046
WBC (/μL)	12,420 ± 607 (8,900–17,500)	9,464 ± 543 (6,600–13,000)	0.180
Lymphocytes (/μL)	2,809 ± 320 (1,284–5,215)	1,735 ± 109.9 (891–3,920)	0.082
CRP (μg/mL)	2.72 ± 0.7 (0.6–8.8)	0.76 ± 0.1 (0.5–1.9)	0.001
Insulin/glucose ratio	0.36 ± 0.07 (0.03–1.07)	4.83 ± 0.57 (2.02–14.6)	0.011
Glucose (mg/dL)	94.4 ± 3.58 (71–118)	81.53 ± 2.3 (67–101)	0.160
Insulin (Mu/L)	12.5 ± 1.73 (2–55)	20.11 ± 2.57 (3.08–81.8)	0.045
Cholesterol (g/dL)	133.8 ± 11.43 (81–267)	191.5 ± 10.2 (130–284)	<0.0001
Triglycerides (mg/dL)	48.4 ± 4.43 (28.3–89.3)	88.05 ± 9.1 (46–187)	<0.0001
Fructosamine (μmol/L)	198 ± 11.9 (80–276)	254 ± 18.43 (136–427)	0.007
Alkaline Phosphatase (U/L)	50.4±4.74 (23.9–88.5)	76.3±12.2 (29.8–195)	0.132

* Values are expressed as mean ± SEM (range in parentheses).

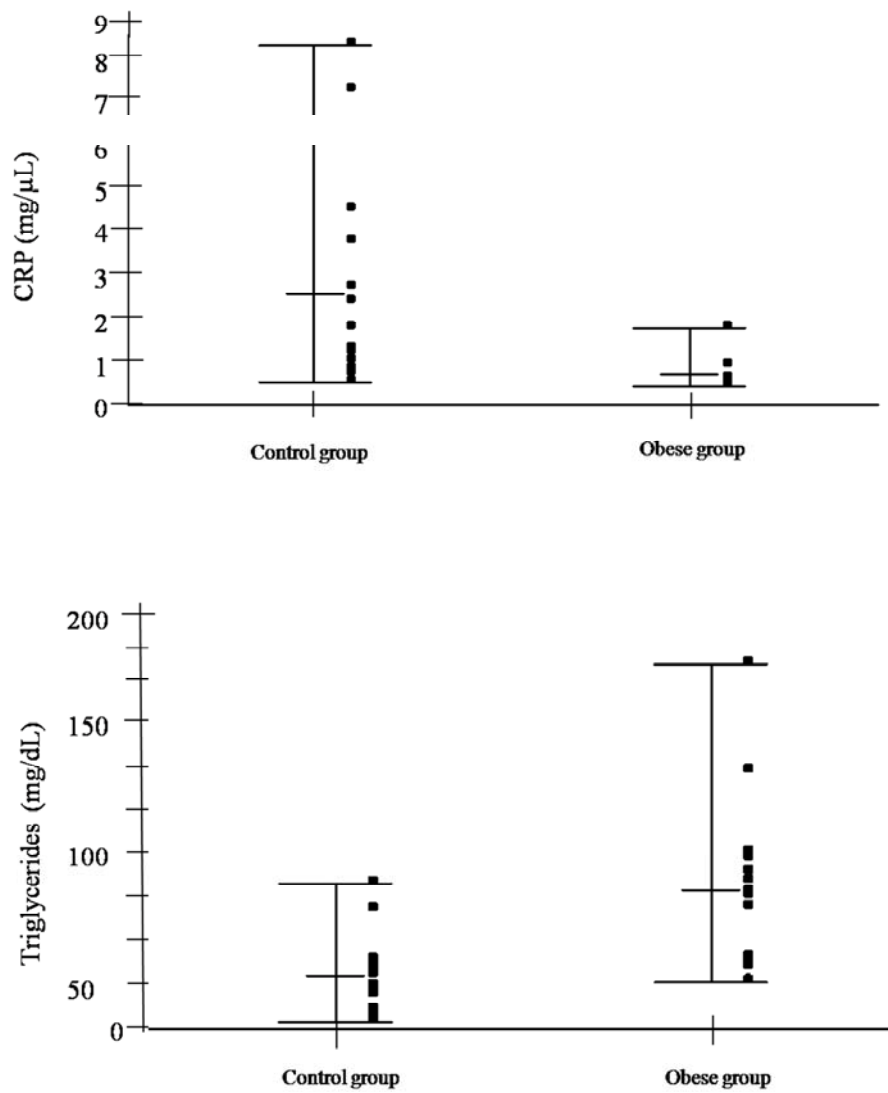


Fig. 1: Variability chart for triglycerides and CRP in control and obese dogs. Horizontal bars show ranges (maximum, median, and minimum quantiles).

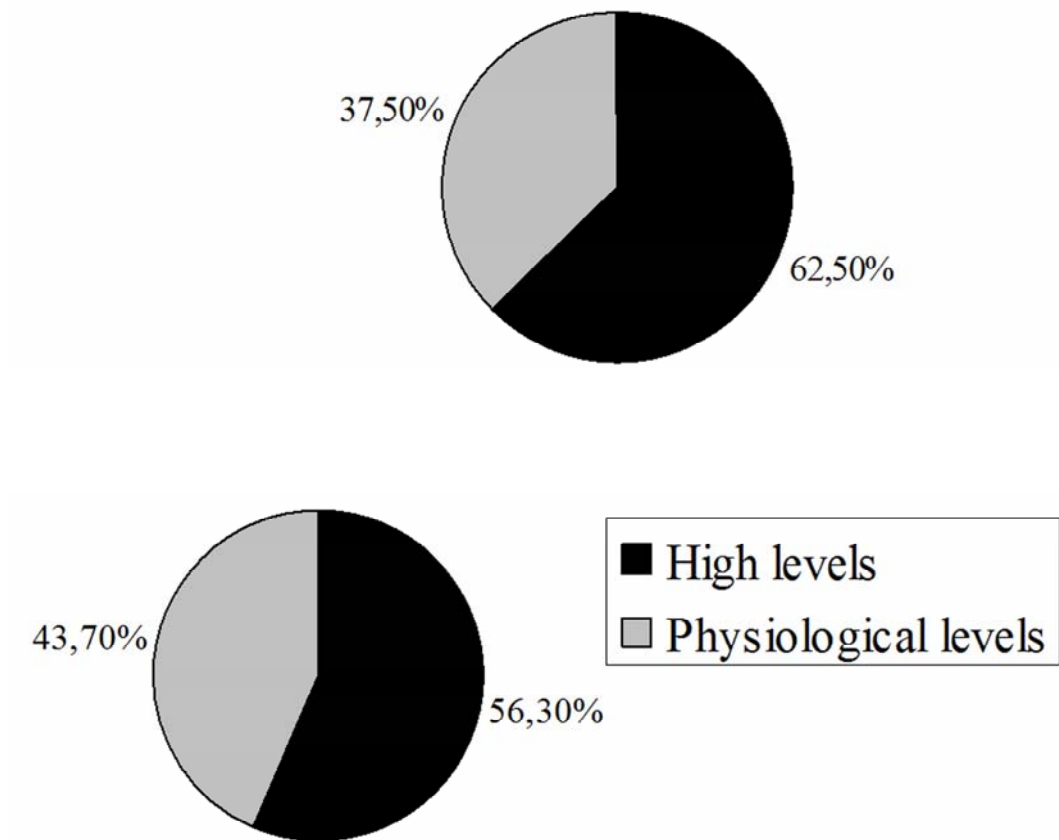


Fig. 2: Percentage of obese animals with high and physiological levels of triglycerides (top) and insulin (bottom).

4.2 ARTIGO 2

4.2.1 A fructosamina como uma ferramenta na avaliação da resistência à insulina em cães obesos

4.2.2 RESUMO

A fructosamina é a forma glicosilada de proteínas sanguíneas. A determinação de seus níveis presta-se para a avaliação da glicemia, já que desconsidera a variação momentânea da glicose no sangue. Objetivando-se avaliar o efeito da resistência à insulina sobre a fructosamina em cães obesos, utilizaram-se três grupos de animais: controles (n=13), obesos sem resistência à insulina (n=6) e obesos resistentes à insulina (n=9). Os animais foram avaliados clínica e laboratorialmente atestando-se como única alteração a obesidade e/ou resistência à insulina nos grupos de cães obesos. Após jejum de 12h foi realizada a coleta de sangue para mensuração de glicose, triglicerídeos, insulina e fructosamina. Uma infusão de glicose 50% foi administrada através da veia cefálica na dose de 0,5 g/kg de peso corporal. Nova coleta de sangue foi realizada após 30 minutos para determinação da glicemia. A resistência à insulina foi determinada pelo cálculo da relação insulina/glicose basal. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA e teste *t* de Student, considerando-se significância de 95%. Foi determinada a correlação entre os parâmetros avaliados. O grupo de cães obesos resistentes à insulina teve valores mais altos de insulina ($p<0,001$), fructosamina ($p<0,05$) e relação insulina/glicose ($p<0,0001$) de jejum, enquanto que os obesos sensíveis à insulina apresentaram maior glicemia pós-prandial ($p<0,01$). Houve correlação positiva entre fructosamina e glicose pós-prandial e fructosamina e relação insulina/glicose ($r=0,4$; $p<0,05$). Ambos os grupos de cães obesos apresentaram níveis glicêmicos basais mais reduzidos que os controles e concentrações séricas de triglicerídeos mais elevadas ($p<0,05$). Os resultados permitem afirmar que a fructosamina serve como uma ferramenta rápida e útil na avaliação da resistência à insulina.

Palavras-chave: obesidade, síndrome metabólica, glicemia, cães, fructosamina.

4.2.3 ABSTRACT

Fructosamine is the glycated form of blood proteins. The determination of its levels is useful for the evaluation of glycaemia, since it does not consider transitory variations of blood glucose. With the aim of evaluating the effect of insulin resistance on the levels of fructosamine in obese dogs, three groups of animals were used: controls (n=13), insulin sensitive obese (n=6) and insulin resistant obese (n=9). The animals were evaluated through clinical and laboratorial examinations, attesting health except for the obesity and/or insulin resistance in obese groups. After 12 h-fasting the animals were submitted to blood collection for glucose, triglycerides, fructosamine, and insulin serum levels measurements. A solution of glucose 50% was infused in cephalic vein through catheterization at a dose of 0.5 g/kg of body weight. A new blood collection was performed after 30 minutes for glucose measurement. Insulin resistance was determined through fasting insulin/glucose ratio calculation. For the statistical analysis ANOVA was used considering a 95% level of significance and for the mean comparison between groups Student's *t* test was used. Pearson's correlation coefficient was determined between the measured parameters. Insulin resistant obese group had higher values of basal insulin ($p<0.001$), fructosamine ($p<0.05$) and insulin/glucose ratio ($p<0.0001$), while insulin sensitive obese dogs showed higher post-prandial glycaemia ($p<0.01$). A positive correlation between fructosamine and post-prandial glycaemia and fructosamine and insulin/glucose ratio was detected ($r=0.4$; $p<0.05$). Both obese groups showed lower levels of basal glycaemia and higher serum concentrations of triglycerides than control ($p<0.05$). The results showed allow saying that fructosamine is a rapid and useful tool for insulin resistance evaluation.

Key-words: obesity, metabolic syndrome, glycaemia, dogs, fructosamine.

4.2.4 INTRODUÇÃO

A obesidade vem se tornando cada vez mais prevalente em animais de companhia, aumentando a suscetibilidade a várias doenças, dentre as quais a mais comum é a diabetes mellitus. A avaliação clínica de animais obesos e o tratamento da obesidade podem evitar que enfermidades mais importantes e incuráveis se desenvolvam. Para tanto é necessário que se estudem técnicas mais simples para acessar a resistência à insulina nestes animais. A fructosamina consiste na reação não-enzimática e irreversível da glicose com resíduos de aminoácidos de proteínas sistêmicas, sendo uma ferramenta prática e eficaz para avaliar a glicemia em um período entre 1 a 3 semanas (BENNET, 2002). Apesar de já ter sido documentado que os níveis plasmáticos de fructosamina aumentam em cães e gatos diabéticos (REUSCH et al., 1993; JENSEN, 1995; PLIER et al., 1998) e que este aumento está relacionado à hiperglicemia (LOSTE & MARCA, 2001; BENNET, 2002), nenhum estudo consistente em cães foi realizado avaliando o efeito da resistência à insulina sobre os níveis séricos de fructosamina, principalmente considerando animais euglicêmicos (FARIA et al., 2005). Além do mais, estudos em humanos comprovaram que os níveis de fructosamina estão reduzidos em indivíduos obesos comparados com os controles (BROUSSOLLE et al., 1991) e que a hiperlipidemia pode ser uma destas causas em cães (REUSCH & HABERER, 2001; BENNET, 2002). Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da resistência à insulina sobre os níveis séricos de fructosamina em cães obesos não diabéticos, hipotetizando-se que a fructosamina sofra influência da resistência à insulina, podendo vir a ser utilizada como ferramenta importante na avaliação desta alteração em cães.

4.2.5 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 28 cães, os quais foram pesados e seu escore de condição corporal (ECC) com 9 pontos determinado por LAFLAMME (1997) foi avaliado, sendo 1=emaciado, 3=magro, 5=ideal, 7=sobrepeso, 9=obeso. Conforme a condição corporal e a relação insulina/glicose em jejum os cães foram classificados em 3 grupos: controles (n=13, ECC 3 ou 5, relação insulina/glicose < 0,235); obesos sensíveis à insulina (n=6, ECC 7 ou 9, relação insulina/glicose < 0,235); obesos resistentes à insulina (n=9, ECC 7 ou 9, relação insulina/glicose > 0,235). Previamente ao estudo, os animais foram

avaliados através de exames clínico-laboratoriais, atestando-se saúde, excetuando-se a obesidade nos grupos de cães obesos. Os animais foram mantidos em jejum por aproximadamente 12 h, quando foram submetidos à coleta de sangue para mensuração sérica de fructosamina (azul de nitrotetrazólio - Labtest. Lagoa Santa, MG, Brasil), insulina (radioimunoensaio, Linco Reserch. Billerica, MA, USA), glicose (glicose-oxidase, Accu-check Active, Roche Diagnostics. São Paulo, SP, Brasil) e triglicérides (glicerol fosfato-oxidase, Labtest Diagnostic S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A relação insulina/glicose foi calculada como uma mensuração da sensibilidade à insulina, considerando-se resistentes à insulina aqueles animais cuja relação insulina/glicose fosse maior que 0,235 (KOGIKA et al., 2001). Os animais foram submetidos à venóclise da veia cefálica e glicose 50% foi administrada na dose de 0,5 g/kg de peso corporal. Nova coleta foi realizada após 30 minutos da administração de glicose para determinação da glicemia (glicose-oxidase, Accu-check Active, Roche Diagnostics. São Paulo, SP, Brasil). O estudo foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e todos os princípios éticos recomendados quanto à utilização de animais em experimentos foram observados (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

A análise estatística foi realizada através do programa JMP 5.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA), onde foi aplicada ANOVA e a comparação entre médias foi determinada pelo teste *t* de Student, utilizando-se o teste de Tukey como pós-teste. Para a análise de correlação entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Foi considerado um nível de significância de 95%.

4.2.6 RESULTADOS

4.2.6.1 Glicemia basal

As médias, erros-padrão da média, valores máximos e mínimos das variáveis estudadas entre os grupos controles, obesos sensíveis à insulina e obesos resistentes à insulina são apresentados na Tabela 1. Os grupos de cães obesos apresentaram valores reduzidos de glicose de jejum em relação aos controles ($p < 0,05$).

4.2.6.2 Insulinemia basal

Os cães do grupo obeso resistente à insulina apresentaram valores maiores de insulina sérica de jejum ($p=0,0003$) quando comparados tanto com os controles quanto com os obesos sensíveis à insulina ($p=0,0023$). Não foi detectada diferença entre os grupos controle e obesos sensíveis à insulina.

4.2.6.3 Fructosaminemia

Os animais obesos resistentes à insulina mostraram valores maiores de fructosamina sérica quando comparados aos controles. Nenhuma diferença foi observada ao se compararem os grupos resistente à insulina e sensível à insulina, ou controle e sensível à insulina. A análise entre este metabólito e a glicemia pós-prandial, assim como a relação insulina/glicose revelou correlação positiva (Figuras 1 e 2).

4.2.6.4 Relação insulina/glicose

Animais obesos resistentes à insulina mostraram maior relação insulina/glicose que os controles ($p<0,0001$) e que os obesos sensíveis à insulina ($p=0,00046$). A comparação entre controles e obesos sensíveis à insulina não mostrou diferença.

4.2.6.5 Glicemia pós-prandial

Trinta minutos após a administração venosa de glicose o grupo obeso sensível à insulina apresentou maior glicemia ($p=0,0025$) quando comparado com o grupo controle. Nenhuma diferença foi verificada ao se compararem os dois grupos de cães obesos, ou os controles com os obesos resistentes à insulina.

4.2.6.6 Trigliceridemia

Ambos os grupos de cães obesos mostrou níveis de triglicédeos séricos mais elevados que os controles ($p=0,0297$), porém não foi verificada diferença entre obesos resistentes à insulina ou sensíveis à insulina.

4.2.7 DISCUSSÃO

Os dados apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 1 e 2 demonstram a importância da utilização da dosagem sérica de fructosamina na avaliação da resistência à insulina em cães. O grupo de cães obesos apresentou valores menores de glicose basal, o que consiste em um achado interessante, ainda que todos os animais do estudo fossem caracterizados como euglicêmicos. Estudos prévios mostraram não haver diferença entre cães obesos e controles quanto à glicemia, e naquele estudo todos os cães apresentaram hipoglicemia leve, o que foi relacionado pelos autores a um longo período de jejum ou um desbalanço alimentar (FARIA et al., 2005). Levando-se esta informação em consideração, pode-se afirmar que as menores taxas de glicose verificadas no presente estudo em cães obesos eram esperadas. Em termos de insulinemia basal, os cães resistentes à insulina tiveram maiores valores séricos do que os outros grupos, o que já havia sido reportado em cães (BLANCHARD et al., 2004) e outras espécies (BROUSSOLLE et al., 1991; APPLETON et al., 2005; SATHIYAPRIYA et al., 2006). Quando se avaliou a relação insulina/glicose, esta foi maior nos cães resistentes à insulina. Este já era um fato esperado, já que este índice foi o que se utilizou para a separação dos animais nas diferentes categorias, no presente estudo. O valor de 0,235 foi considerado como determinante do limite da resistência à insulina no estudo, com embasamento em publicações prévias (KOGIKA et al., 2001). Este índice foi utilizado em outros trabalhos na avaliação da resistência à insulina (VARGAS et al., 2004; APPLETON et al., 2005).

Quanto à glicemia pós-prandial de 30 minutos, o grupo de obesos sensíveis à insulina apresentou maiores valores comparados com os controles, não sendo verificada diferença entre os resistentes à insulina e os controles. Este fato não era esperado, já que a resistência à insulina leva a uma maior

valores de fructosamina nos diferentes momentos da curva glicêmica (MARCA et al., 2000).

Os níveis séricos de fructosamina no presente estudo foram mais elevados nos cães resistentes à insulina comparados aos controles, fato já descrito em humanos (SATHIYAPRIYA et al., 2006) e foi detectada uma correlação positiva entre os níveis de fructosamina e a relação insulina/glicose (Figura 1). Clinicamente isto sugere que nos cães resistentes à insulina deste estudo houve episódios de maior glicemia do que nos controles no período de 1 – 3 semanas (BENNET, 2002). REUSCH & HABERER (2001) e BENNET (2002) relataram que a fructosamina pode sofrer supressão pela hiperlipidemia e BROUSSOLLE et al. (1991) comprovaram que os níveis de fructosamina estão reduzidos em indivíduos obesos comparados com os controles. No presente estudo, apesar de os animais obesos apresentarem maiores níveis de triglicérides, o que poderia ter colaborado para o desenvolvimento da hiperlipidemia, este efeito não foi observado. Assim, pode-se afirmar que a fructosamina consiste em um bom parâmetro para a avaliação da resistência à insulina, já que outros métodos existentes (testes de resistência à glicose ou à insulina, *clamp* hiperinsulinêmico) são mais dispendiosos, tanto em termos de tempo quanto de custo, além de serem também mais desgastantes para o animal. Estudos prévios avaliaram o comportamento deste metabólito quanto à glicemia e à obesidade em cães (MARCA et al., 2000; LOSTE & MARCA, 2001; WATANABE et al., 2004; MARTIN et al., 2006), porém nenhum deles avaliou o efeito da resistência à insulina sobre ele. Ademais, no estudo em que foi avaliado o efeito da obesidade (MARTIN et al., 2006), foi realizada comparação entre cães com sobrepeso e obesos, sem controles; no estudo que avaliou níveis de fructosamina e o teste de tolerância a glicose (WATANABE et al., 2004) não foram utilizados animais obesos e não foi feita análise estatística. Com isto, no conhecimento dos autores, inexistem dados na literatura a respeito do efeito da resistência à insulina e obesidade nas concentrações de fructosamina em cães, tornando os achados aqui apresentados inovadores.

4.2.8 CONCLUSÃO

A fructosamina aumenta nos cães obesos com resistência à insulina, podendo ser mensurada com este propósito de avaliação.

4.2.9 AGRADECIMENTOS

A Waltham Foundation e CNPq pelo apoio financeiro.

4.2.10 REFERÊNCIAS

APPLETON, D.J. et al. Basal plasma insulin and homeostasis model assessment (HOMA) are indicators of insulin sensitivity in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.7, n.3, p. 183-193, 2005.

BENNET, N. Monitoring techniques for diabetes mellitus in dogs and cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.17, n. 2 65-69, 2002.

BLANCHARD, G. et al. Rapid weight loss with a high-protein low-energy diet allows the recovery of ideal body composition and insulin sensitivity in obese dogs. **The Journal of Nutrition**, v.134, n. 8, p. 2148S-2150S, 2004.

BROUSSOLLE, C. et al. Evaluation of the fructosamine test in obesity: consequences for the assessment of past glycemic control in diabetes. **Clinical Biochemistry**, v. 24, n.2 p. 203-209, 1991.

FARIA, P.F. et al. Glicemia em cães obesos e senis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n.1, p. 47-50, 2005.

JENSEN, A.L. Glycated blood protein in canine diabetes mellitus. **Veterinary Records**, v. 137, n. 16, p. 401-405, 1995.

KOGIKA, M.M. et al. Determinação das concentrações séricas de glicose e insulina de cães em choque endotóxico. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 813-817, 2001.

LAFLAMME, D.P. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine practice**,v. 22, n. 2, p. 10-15, 1997.

LOSTE, A. & MARCA, M.C. Fructosamine and glycated haemoglobin in the assessment of glycaemic control in dogs. **Veterinary Research**, v. 32, n.1, p. 55-62, 2001.

MARCA, M.C. et al. Effect of hyperglycaemia on serum fructosamine and blood glycated haemoglobin concentrations in canine samples. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n.1, p.11-16, 2000.

MARTIN, L.J.M. et al. Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 9, p. 355-360, 2006.

- PLIER, M.L. et al. Serum fructosamine concentration in nondiabetic and diabetic cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 27, n. 2, p. 34-39, 1998.
- REUSCH, C.E. & HABERER, B. Evaluation of fructosamine in dogs and cats with hypo- or hyperproteinaemia, azotaemia, hyperlipidaemia and hyperbilirubinaemia. **Veterinary Record**, v. 148, n. 12, p. 370-376, 2001.
- REUSCH, C.E. et al. Fructosamine. A new parameter for diagnosis and metabolic control in diabetic dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.7, n. 2, p. 177-182, 1993.
- SATHIYAPRIYA, V. et al. Insulin resistance and enhanced protein glycation in men with prehypertension. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 12, p. 1457-1461, 2006.
- VARGAS, A.M. et al. Abnormal subcellular distribution of GLUT4 protein in obese and insulin-treated diabetic female dogs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 7, p. 1095-1101, 2004.
- WATANABE, D. et al. Oral glucose tolerance test and determination of serum fructosamine levels in Beagle dogs. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 33-36, 2004.

Tabela 1 - Médias, erros-padrão da média, valores máximos e mínimos das variáveis estudadas em cães controles, obesos sensíveis à insulina e obesos resistentes à insulina.

Variável	Controles	Obesos sensíveis à insulina	Obesos resistentes à insulina
Glicose basal (mg/dL)	94±3,86 ^A (86,1-109,2)	81,7±4,01 ^B (71,3-92)	82,9±3,62 ^B (74,5-91,2)
Insulina basal (μU/mL)			

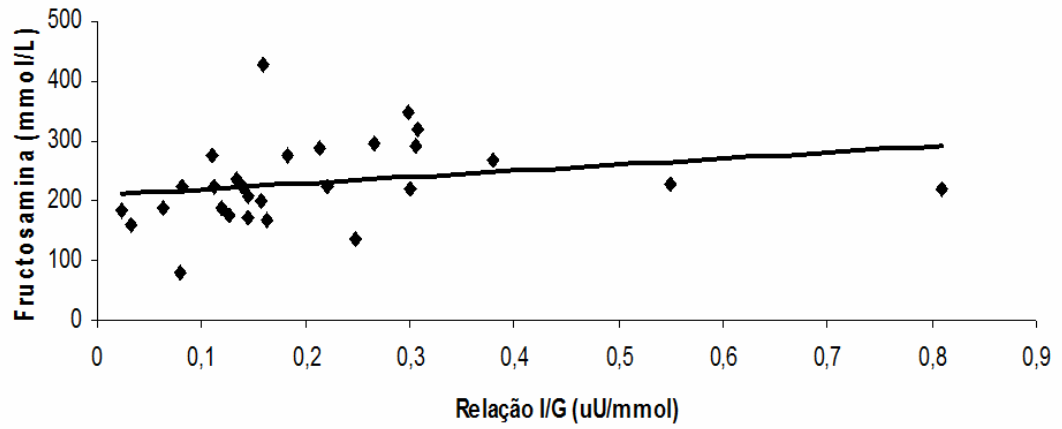


Figura 1 – Correlação entre níveis de fructosamina e relação I/G em cães obesos e controles ($r=0,4$; $p=0,039$).

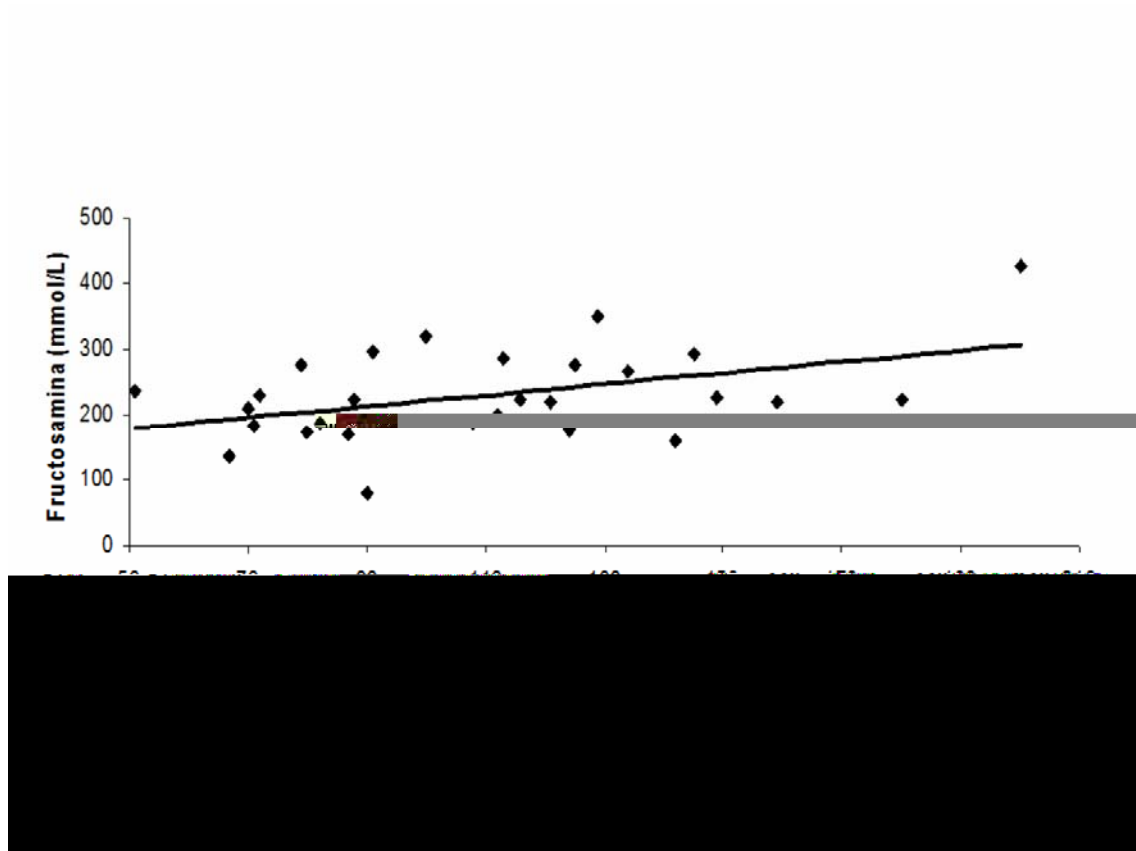


Figura 2 – Correlação entre níveis de fructosamina e glicose pós-prandial em cães obesos e controles ($r=0,4385$; $p=0,0196$).

4.3 ARTIGO 3

4.3.1 White adipose and muscular tissue insulin signaling in insulin-resistant obese dogs: differential GLUT4 translocational pattern

4.3.2 INTRODUCTION

Obesity is increasing in domestic animals as well as in humans and is the subject of much research. Adipose and muscular tissues play important roles in insulin-stimulated glucose regulation and maintenance of homeostasis (Olson and Pessin 1996). Glucose transporter 4 (GLUT4) is the major protein involved in glucose transport in these tissues (Vargas et al. 2004). The impairment of GLUT4 translocation in these tissues from an intracellular pool to the plasma membrane (PM) is considered, at least in part, to be responsible for the insulin resistance that develops in such tissues in many species. The importance of altered GLUT4 translocation in dogs is controversial (Vargas et al., 2004). It is well known that there are differences in glucose metabolism between dogs and other species such as cats, rodents and humans (Saad, 2004), thus it is imperative that specific data for dogs are available for correct clinical intervention. The aim of this study was to evaluate GLUT4 translocation in white adipose tissue (WAT) and skeletal muscle (SM) of obese, insulin-resistant dogs in their naturally high blood insulin condition, since most of the information available used exogenous stimulation of the translocation of GLUT4 (Klip et al. 1987, Baron et al. 1995, Miyata et al. 1998, Garvey et al. 1998, Miura et al. 2001, Seraphim et al. 2001).

4.3.3 MATERIAL AND METHODS

4.3.3.1 Animals and collection

Fifteen obese mixed-breed dogs that were brought by their owners into the animal clinic were recruited for this study. Fifteen lean control dogs were recruited from the University kennels. Body scores were determined on the 9-point scoring system proposed by Laflamme (1997). All dogs were evaluated through laboratorial tests (hemogram, platelet count, serum determination of alanine transaminase, alkaline phosphatase, creatinine and blood urea nitrogen concentrations, and urinalysis) before the experiment, making sure that the only clinical problem was obesity (in obese group). On the day of sample collection, all dogs were fasted for 12 to 16 hours and subjected to an intra-venous glucose tolerance test (IVGTT). Before the test, blood was collected by venipuncture for determination of fasting glucose (time 0), insulin (time 0), fructosamine, cholesterol, and triglyceride concentrations. For the test, a glucose solution (50%) was administered at 0.5 g/kg of body weight through a pre-inserted catheter. After the glucose administration, blood was collected at 15, 30, 45, 60, and 90 minutes for glucose concentration measurements and 30, 60, and 90 minutes for insulin concentration measurements (Kaneko, 1997). The results were plotted against time and the areas under the glucose and insulin curve (AUC_g and AUC_i, respectively) were calculated. The obese dogs were consequently subclassified as insulin sensitive (n=6) and insulin resistant (n=9).

Right after the IVGTT, the dogs were anesthetized and submitted to surgical removal of approximately 2 g of *rectum abdominal* muscular and subcutaneous fat tissues. The surgical procedures were carried out according to the Universidade Federal

do Rio Grande do Sul (UFRGS) Veterinary Hospital. The anesthetic procedure included pre-anesthetic drugs (meperidine, 2 mg/kg), anesthetic induction drugs (0.5 mg/kg midazolam and 5 mg/kg ketamine), and anesthetic maintenance (isoflurane inhalation). As soon as the incision was performed, WAT and SM samples were collected. The tissues were immediately frozen to -20C until analysis. The study was approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Veterinary Hospital animal care committee and was performed under the principles set down by the Brazilian College of Animal Experimentation.

4.3.3.2 Blood and urine analysis

Hemogram was performed with a semi-automatic cell counter (CELM, Barueri, São Paulo, Brazil) and optical microscopy. Platelet counts were performed in a Neubauer counting chamber (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) through optical microscopy. Urinalysis was performed with urine strips (Multistix SG, Bayer, São Paulo, SP, Brazil), refractometry and optical microscopy. Glucose was determined with an automatic portable glucose analyzer (Accu-Check Active, Roche, São Pulo, SP, Brazil). ALP, ALT, creatinine, urea, fructosamine, cholesterol and triglyceride concentrations were measured in a semi-automatic spectrometer (CELM, Barueri, SP, Brazil) with enzymatic kits (Bioclin, Lagoa Santa, MG, Brazil). Insulin levels were determined with a RIA kit (Millipore Corporation, Bilerica, MA, USA) validated for dog serum (Koyama et al., 2002).

4.3.3.3 Cell fractionation and Western Blotting

White adipose tissue was fractionated as described (Vargas et al. 2004). Briefly, 0.5-1 g of tissue were thawed and homogenized on ice in TES buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose) containing a protease inhibitor cocktail (Complete mini EDTA free, Roche) in a 1:7/weight:volume ratio in a Polytron PT 3000 Kinematica (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). The homogenate was centrifuged at 3,000 g for 15 min at 4C. Fat-free extract was centrifuged at 12,000 g for 20 min, and the pellet obtained was suspended in 0.5 ml of buffer (the plasma membrane-rich fraction). The supernatant was then centrifuged at 20,000 g for 20 min, and the resulting supernatant was centrifuged at 150,000 g for 60 min. The final pellet was resuspended in 0.5 mL of buffer, providing the microsomal fraction.

Muscular tissue was fractionated as described (Miyata 1998). Briefly, 0.5-1 g of tissue was homogenized in a sucrose-HEPES buffer (250 mM/L sucrose, 20mM/L HEPES, pH 7.4) and centrifuged at 34,000 g for 20 min at 4C. Purified plasma membrane (PM) was prepared by resuspending the pellet in sucrose-HEPES buffer, followed by centrifugation for 1 hr at 227,000 g at 4C. The pellet was resuspended in 34% sucrose – 20mM HEPES buffer and was fractionated with centrifugation for 16.5 hr at 68,000 g. The PM fraction was finally centrifugated at 227,000 g for 60 min. Low-density microsomes (MF) from skeletal muscle was prepared from the supernatant of the first centrifugation (34,000 g). The fraction for MF was collected by centrifugation at 135,000 g for 60 min and was finally centrifuged for 60 min at 227,000 g. Each resulting pellet from each fraction from purified PM and MF was resuspended in sucrose-HEPES buffer.

Protein concentration of the samples was determined by the method of Bradford, using BSA as standard. Three experiments were performed with a different set of control and obese (or control, obese insulin sensitive, and insulin resistant) samples. Equal amount of protein (30 μg for white adipose tissue and 100 μg for skeletal muscle) from samples were subjected to SDS-PAGE with 15% acrylamide gels. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose (WAT) or PVDF (SM) membranes. The membranes were blocked with 5% skim milk diluted in PBS for 1h and immunoblotted with goat anti-GLUT4 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) at 1:500 overnight at 4C. The visualization was performed by chemiluminescence through incubation of the membranes with a secondary donkey anti-goat HRP-conjugated antibody (1:5000), followed by the incubation of the membranes with Immobilon-Western (Millipore Corporation, Bilerica, MA, USA) and exposure to X-ray film. The films were scanned and the intensity of the immuno-specific bands quantified by NIH Image software. The results are reported as arbitrary units (AU) per μg protein.

4.3.3.4 Statistical analysis

The data were analyzed through the program JMP 5.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). ANOVA and Student's *t* test were applied to detect differences between obese and control animals. In a second set of analyses, differences were compared between control, insulin sensitive obese, and insulin resistant obese groups. GLUT4 translocation was assessed by calculating the translocation index as $\text{PM}/(\text{PM}+\text{MF})$ (Seraphim et al., 2001), Correlations was detected through Pearson's correlation coefficient. A

probability level of <0.05 was considered significant. The results are expressed as mean \pm standard error (S.E.M).

4.3.4 RESULTS

4.3.4.1 Control versus obese dogs

Serum basal insulin and insulin/glucose ratios were higher in obese than in lean dogs (Table 1; $p < 0.05$). Compared with controls, obese dogs showed increased glucose levels at 15 minutes after venous glucose administration (Figure 1), and increased insulin at 30 minutes (Figure 2); AUC_g, AUC_i, and AUC_i/AUC_g ratio were consequently higher in obese than in control dogs (Table 1; $p < 0.05$). Furthermore, levels of cholesterol, triglycerides and fructosamine were increased in obese group compared with control group (Table 1).

Western blot analysis showed that microsomal and plasma membrane GLUT4 protein abundance was lower ($p < 0.05$) in obese compared with control dogs in both WAT (Figure 3) and SM (Figure 4). Relative abundance of GLUT4 protein did not differ between microsomal and plasma membrane compartments in WAT or SM of control dogs, but GLUT4 protein abundance was greater in the microsomal fraction than in plasma membrane in obese dogs (Figure 5). There were no differences between subcellular fractions in control or obese dogs in SM (Figure 6), however, there was a strong correlation between muscular PM fraction of GLUT4 and AUC_g ($p < 0.05$; $r = 0.89$). The translocation index was reduced in obese dogs in both tissues ($p < 0.05$), as observed in Table 2.

4.3.4.2 Comparison between insulin sensitive and insulin resistant obese dogs

When obese group was separated into two groups according with their insulin sensitivity, the insulin resistant obese group had higher values of basal insulin ($p<0.001$), fructosamine ($p<0.05$) and insulin/glucose ratio ($p<0.0001$), while insulin sensitive obese dogs showed higher glycaemia at 30 minutes ($p<0.01$), as shown in Table 3. Furthermore, AUC_i was higher in obese insulin resistant dogs ($p<0.05$). A positive correlation between fructosamine and glycaemia at 30 minutes and fructosamine and insulin/glucose ratio was detected ($r=0.4$; $p<0.05$). Both obese groups showed lower levels of basal glycaemia and higher serum concentrations of triglycerides than controls ($p<0.05$).

Western analysis revealed that, in WAT, GLUT4 protein levels were lower in insulin resistant obese dogs compared to controls, whereas there was no differences between insulin-sensitive obese dogs and controls (Figure 7). The translocation index was not different between insulin-sensitive and insulin-resistant dogs, but was lower in insulin resistant compared with control dogs in WAT (Table 4, $p<0.05$). No difference was detected for SM fractions or in translocation index for this tissue among the three groups.

4.3.5 DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that GLUT4 protein levels in muscle and fat are significantly lower in obese compared with control, lean dogs. Further, we divided obese dogs into insulin-sensitive and insulin-resistant groups and assessed the normal levels of GLUT4. This study therefore goes beyond most previous studies in companion animals, which have investigated experimental induction of obesity and/or

calorie restriction to simulate leanness. (Bennet 2002, Blanchard 2004, Martin 2006, Gayet et al. 2007). This analysis demonstrates that there is a significant inhibition of plasma membrane GLUT4 protein content in adipose tissue in insulin-resistant compared to insulin-sensitive obese dogs. These data are similar to those reported in humans (Garvey et al. 1998; Gayet et al., 2007).

The majority of reports on GLUT4 evaluated the effect of insulin administration on its translocation (Klip et al. 1987, Baron et al. 1995, Miyata et al. 1998, Garvey et al. 1998, Miura et al. 2001, Seraphim et al. 2001), therefore it would not be wise to compare them to studies in animals in which insulin secretion is chronically higher, as in the present study.

In dogs and cats, GLUT4 expression was lower in both WAT and SM in obese, insulin resistant animals compared to lean animals (Brennan et al. 2004; Gayet et al., 2007), and in agreement with this we found reduced GLUT4 protein levels in both tissues of obese dogs. Abnormal subcellular distribution of GLUT4 protein has been reported in dogs, with decreased plasma membrane GLUT4 content and increased microsomal GLUT4 content in obese compared to lean dogs (Vargas et al. 2004). However, we report here that PM and MF GLUT4 protein abundance is reduced in obese dogs. We also demonstrate that tonic levels of adipose MF:PM GLUT4 are higher in obese than in lean dogs, which is the opposite of changes observed in rats (Papa et al. 2002). This potentially represents a major species difference between mice and dogs that should be considered when evaluating rodent studies.

In agreement with previous studies in humans, cats and rodents (Friedman et al. 1992; Zorzano et al. 1998; Seraphim et al. 2001, Brennan et al. 2004), we observed that the regulation of GLUT4 translocation in SM does not follow the same pattern as in WAT if insulin resistance is taken into account, but is exactly the same if the only

change considered is obesity. This difference between tissues may reflect in part the difficulty in fractionating SM compared to WAT (Klip et al. 1987, Olson and Pessin 1996, Russell et al. 1998).

Other studies that did not verify changes in SM of obese subjects and rodents (Friedman et al. 1992, Olson and Pessin 1996, Zorzano et al. 1998) disagree with the present experiment, since it was found here a reduction in SM content and in the translocation index of GLUT4 in obese dogs (Figure 4), followed by a strong correlation between AUC_g and SM PM fragment, which means, reinforced by the higher AUC_g (Figure 1) in obese dogs, that the more glucose intolerant, the less GLUT4 translocates to PM in muscle, although no changes were observed when the obese group was separated into insulin resistant and insulin sensitive obese dogs. The reason for these similarities could be also the mobilization of GLUT4 to another fragment of the cytosol, as observed in studies in humans (Garvey et al. 1998), but this was not evaluated in the present study.

4.3.6 CONCLUSION

WAT and SM show different patterns of translocation in obese dogs when insulin resistance is present, but the same pattern when only obesity is investigated: both plasma membrane and microsomal fractions are diminished with the onset of obesity. This difference could be a cause of technical difficulties in SM fractionation, or the migration of GLUT4 protein to other intracellular compartments. Also, obese dogs show a mobilization in GLUT4 protein to the microsomes in WAT, which could be responsible for the insulin resistance in this species.

4.3.7 ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)–Brazil.

4.3.8 SUMMARY

White adipose tissue (WAT) and skeletal muscle (SM) are responsible for glucose metabolism and homeostasis, which is regulated by glucose transporter 4 (GLUT4). The aim of this study was investigate the pattern of GLUT4 translocation in WAT and SM tissues from obese dogs. Thirty dogs were used, fifteen lean (control group) and fifteen overweight (obese group) dogs whose glucose tolerance was tested. WAT and SM biopsies were performed and tissues fractionated for analysis of GLUT4 protein in plasma membrane (PM) and microsomal fractions (MF). Tissue GLUT4 protein levels were lower in obese versus control dogs in both WAT and SM. Obese dogs had more tonic GLUT4 in MF compared to PM, while controls showed similar GLUT4 levels between fractions. When insulin sensitivity was considered, insulin-resistant but not insulin-sensitive dogs showed lower GLUT4 fractions and translocation index in WAT compared to controls, with no difference detected in SM. In conclusion, deficient GLUT4 translocation may play a role in insulin resistance in obese dogs.

Key-words: insulin resistance, obesity, dogs.

4.3.9 REFERENCES

- Baron, A.D.; Zhu, J.S.; Zhu, J.H.; Weldon, H.; Maianu, L.; Garvey, W.T., 1995:
Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4
translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity. *J Clin Invest*
96: 2792-2801.
- Bennet, N., 2002: Monitoring techniques for diabetes mellitus in dogs and cats. *Clin
Tech Small Anim Pract* **17**: 65-69.
- Blanchard, G.; Nguyen, P.; Gayet, C.; Leriche, I.; Siliart, B.; Paragon, B.M., 2004:
Rapid weight loss with a high-protein low-energy diet allows the recovery of
ideal body composition and insulin sensitivity in obese dogs. *J Nutr* **134**
(suppl.): 2148S-2150S.
- Brennan, C.L.; Hoenig, M.; Ferguson, D.C., 2004: GLUT4 but not GLUT1 expression
decreases early in the development of feline obesity. *Domest Anim Endocrinol*
26: 291-301.
- Friedman, J.E.; Dohm, G.L.; Leggett-Frazier, N. Elton, C.W.; Tapscott, E.B.; Pories,
W.P.; Caro, J.F., 1992: Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle
of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport
and glucose transporter GLUT4. *J Clin Invest* **89**:701-5.
- Garvey, W.T.; Maianu, L.; Zhu, J.H.; Brechtel-Hook, G.; Wallace, P.; Baron, A.D.,
1998: Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4
glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J
Clin Invest* **101**:2377-2386.

- Gayet, C.; Leray, V.; Saito, M.; Siliart, B.; Nguyen, P., 2007: The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes, in dogs. *Br J Nutr* **98**:497-503.
- German, A.J., 2006: The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr* (suppl.) **136**: 1940S–1946S.
- Kaneko, J.J., 1997: *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th edn. Academic Press, New York, USA.
- Klip, A.; Ramlal, T.; Young, D.A.; Holloszy, J.O., 1987: Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles. *FEBS Lett* **224**:224-230.
- Koyama, Y.; Galassetti, P.; Coker, R.H.; Peneck, R.; Lacy, D.B.; Davis, S.N., 2002: Prior exercise and the response to insulin induced hypoglycemia in the dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**: 1128-1138.
- Laflamme, D.P., 1997: Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine pract* **22**: 10-15.
- Martin, L.J.M., Siliart, B.; Dumon, H.J.W.; Nguyen, P.G., 2006: Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr* **90**:355–360.
- Miura, T.; Suzuki, W.; Ishihara, E.; Arai, I.; Ishida, H.; Seino, Y.; Tanigawa, K., 2001: Impairment of insulin-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle and adipose tissue in the Tsumura Suzuki obese diabetic mouse: a new genetic animal model of type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* **145**:785-790.
- Miyata, T.; Taguchi, T.; Uehara, M.; Isami, S.; Kishikawa, H.; Kaneko, K.; Araki, E.; Schichiri, M., 1998: Bradikinin potentiates insulin-stimulated glucose uptake

and enhances signal through the bradikinin B₂ receptor in dog skeletal muscle and rat L6 myoblasts. *Eur J Endocrinol* **138**: 344-352.

Olson, A.L.; Pessin, J.E., 1996: Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* **16**:235-256.

Papa, P.C.; Vargas, A.M.; Vargas, J.L.T.; Nunes, M.T.; Machado, U.F., 2002: GLUT 4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. *Life Sci.* **61**: 1917-1928.

Russell, R.R.; Yin, R.; Caplan, M.J.; Hu, X.; Ren, J.; Shulman, G.I.; Sinusas, A.J.; Young, L.H., 1998: Additive effects of hyperinsulinemia and ischemia on myocardial GLUT1 and GLUT4 translocation in vivo. *Circulation* **98**: 2180 - 2186.

Saad, F.M.O.B., 2004: Programas de redução de peso para cães e gatos [Weight loss programs for dogs and cats]. In: Biagi, J.D. (ed.), IV Simpósio sobre nutrição de animais de estimação. CBNA, Campinas, SP, Brazil Vol 1:1-48.

Seraphim, P.M.; Nunes, M.T.; Machado, U.F., 2001: GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. *Braz J Med Biol Res* **34**: 1353-1362.

Vargas, A.M.; Barros, R.P.A.; Zampieri, R.A.; Okamoto, M.M.; Papa, P.C.; Machado, U.F., 2004: Abnormal subcellular distribution of GLUT4 protein in obese and insulin-treated diabetic female dogs. *Braz J Med Biol Res* **37**:1095-1101.

Zorzano, A.; Sevilla, L.; Tomas, E.; Camps, M.; Guma, A.; Palacin, M., 1998: Trafficking pathway of GLUT4 glucose transporters in muscle. *Int J Mol Med* **2**:263-271

Table 1. Results of blood analyses in control and obese dogs (mean \pm SEM).

Variable	Control dogs	Obese dogs	p value
Glucose (mg/dL)	94.4 \pm 3.58	81.53 \pm 2.3	0.160
Insulin (mU/L)	12.5 \pm 1.73	20.11 \pm 2.57	0.045
Insulin/glucose ratio	0.36 \pm 0.07	4.83 \pm 0.57	0.011
AUCg	9405.5 \pm 355.2	10795 \pm 355.2	0.0099
AUCi	1509.51 \pm 549.7	3519.43 \pm 549.7	0.015
AUCi/AUCg ratio	0.159 \pm 0.05	0.320 \pm 0.05	0.0198
Cholesterol (g/dL)	133.8 \pm 11.43	191.5 \pm 10.2	<0.0001
Triglycerides (mg/dL)	48.4 \pm 4.43	88.05 \pm 9.1	<0.0001
Fructosamine (μ mol/L)	198 \pm 11.9	254 \pm 18.43	0.007

AUCg, area under curve for glucose following glucose tolerance test; AUCi, area under curve for insulin.

Table 2. Mean \pm SEM of GLUT4 translocation index in obese and control dogs

	Control dogs	Obese dogs	p value
White adipose tissue	2975 \pm 418	1301 \pm 418	0.03
Skeletal muscle	5157 \pm 376	998 \pm 376	0.0015

Significance levels p 0.05, Student's *t* test.

Table 3. Mean \pm SEM of the variables related to insulin sensitivity in control, insulin sensitive, and insulin resistant obese dogs

	Control dogs	Insulin sensitive obese dogs	Insulin resistant obese dogs
Basal glucose (mg/dL)	94 \pm 3,86 ^A	81,7 \pm 4,01 ^B	82,9 \pm 3,62 ^B
Basal insulin (mU/L)	11,28 \pm 1,33 ^B	11,39 \pm 2,05 ^B	32,8 \pm 6,62 ^A
Insulin/glucose ratio	0,118 \pm 0,01 ^B	0,145 \pm 0,03 ^B	0,385 \pm 0,06 ^A
Fructosamine (μ mol/L)	197 \pm 13,8 ^B	259 \pm 37,4 ^{A,B}	259,6 \pm 21,6 ^A
Glucose 30 minutes (mg/dL)	94,8 \pm 5,44 ^{A,B}	139,2 \pm 21,55 ^A	113,1 \pm 10,77 ^B
Triglycerides (mg/dL)	49,9 \pm 8,5 ^B	84,08 \pm 12,5 ^A	89,9 \pm 10,2 ^A

* Different letters in the same line indicate statistic difference ($p < 0.05$, t test)

Table 4. GLUT4 translocation index (mean \pm SEM) in control, insulin sensitive, and insulin resistant obese dogs.

	Control dogs	Insulin sensitive obese dogs	Insulin resistant obese dogs
White adipose tissue	1800 \pm 270 ^A	1074 \pm 270 ^{AB}	676 \pm 270 ^B
Skeletal muscle	2704 \pm 454 ^A	2850 \pm 454 ^A	2037 \pm 454 ^A

* Different letters in the same line indicate statistic difference ($p < 0.05$, t test)

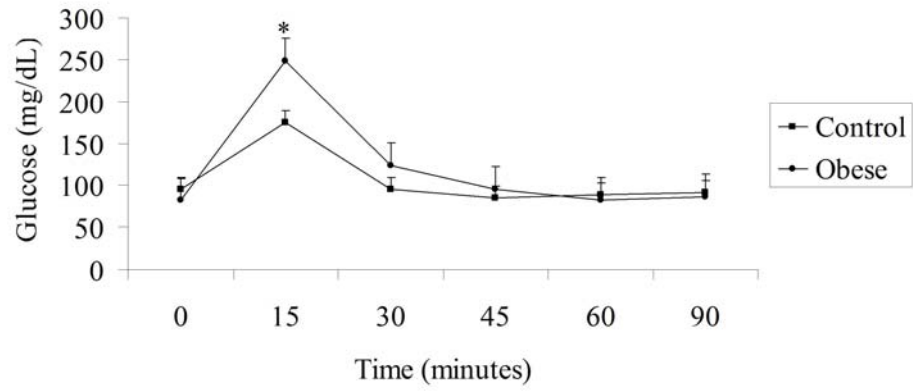


Fig.1 – Mean (\pm SEM) serum glucose concentrations during intravenous glucose tolerance test (IVGGT) in control and obese dogs (* $p < 0.05$).

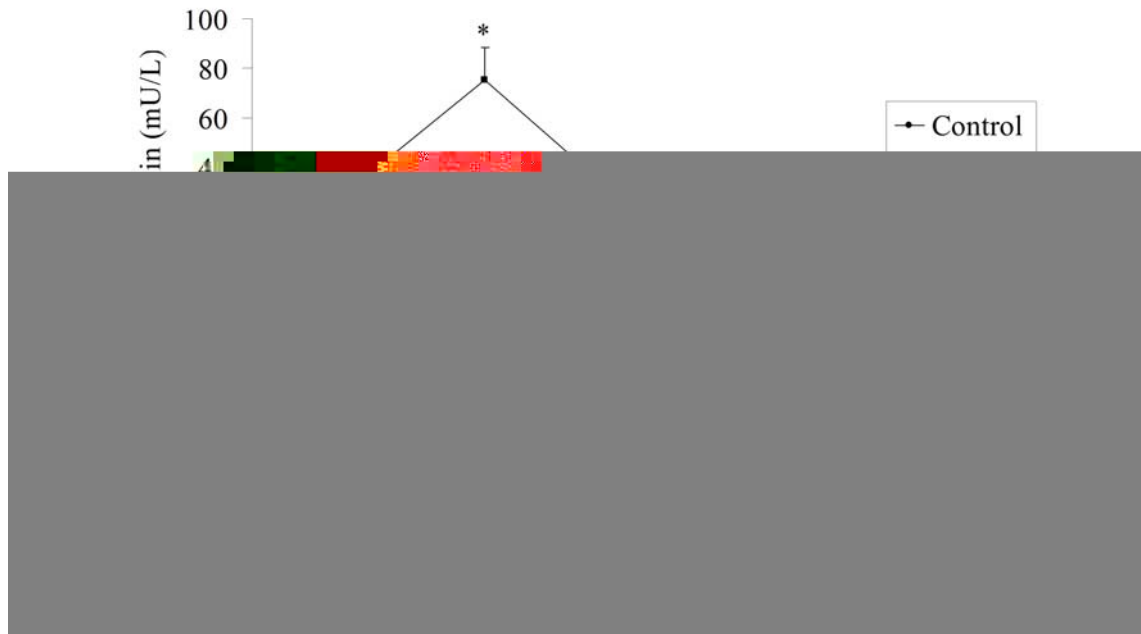


Fig. 2 – Mean (\pm SEM) serum insulin concentration during intravenous glucose tolerance test (IVGGT) in control and obese dogs (* $p < 0.05$).



Fig. 3 – White adipose tissue mean content of GLUT4 protein in plasma membrane (PM) and microsomal fraction (MF) of obese and control dogs (* $p < 0.05$).

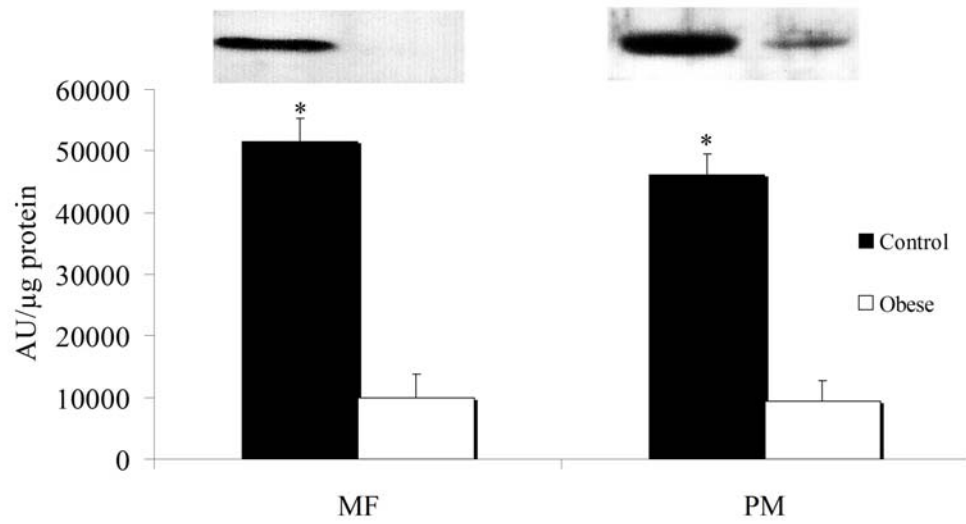


Fig. 4 – Skeletal muscle mean content of GLUT4 protein in plasma membrane (PM) and microsomal fraction (MF) of obese and control dogs (* $p < 0.05$).

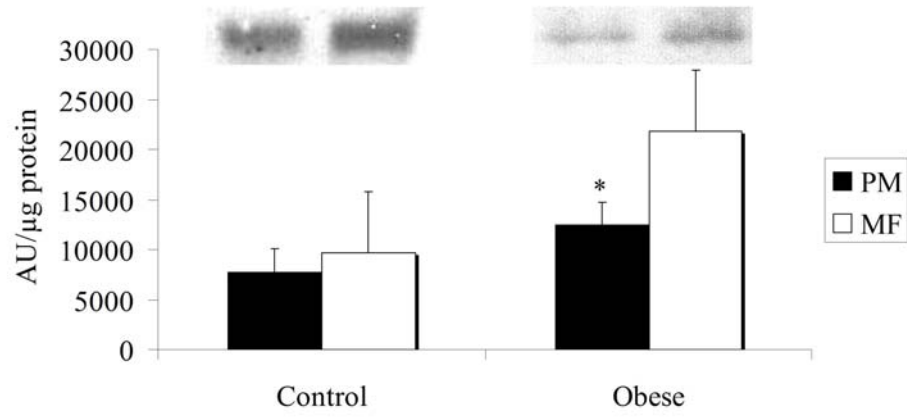


Fig. 5 – Comparison between cell fragments mean content of GLUT4 protein in white adipose tissue (WAT) of obese and control dogs (* $p < 0.05$). Plasma membrane (PM) and microsomal fraction (MF).

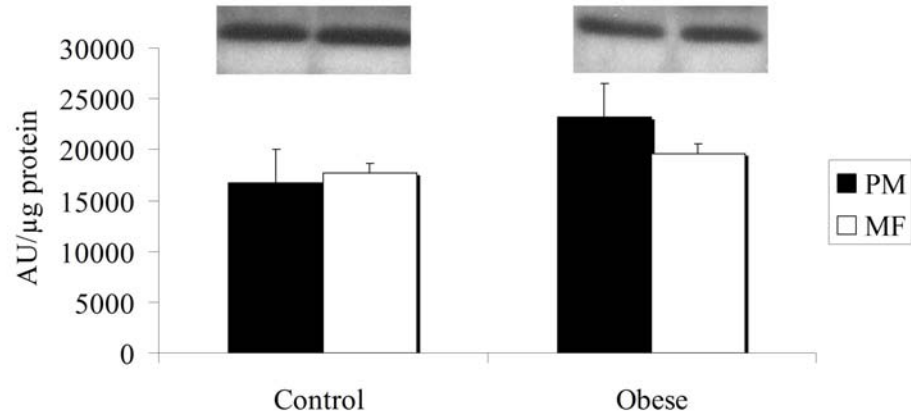


Fig. 6 - Plasma membrane (PM) and microsomal fraction (MF) mean content of GLUT4 protein in skeletal muscle (SM) of obese and control dogs.

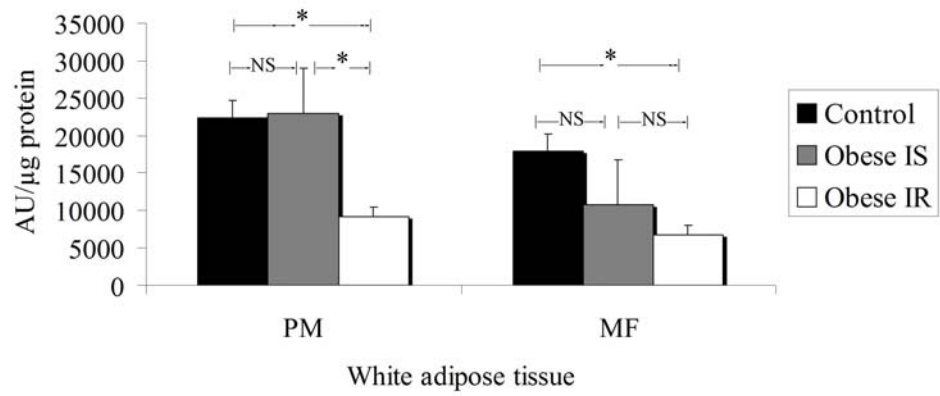


Fig. 7 – White adipose tissue mean content of GLUT4 protein in control, insulin sensitive (IS) and insulin resistant (IR) obese dogs (* $p < 0.05$).

5 DISCUSSÃO GERAL

Através deste estudo é possível constatar que os caninos obesos apresentam alta suscetibilidade a diabetes mellitus, o que foi verificada por valores maiores de colesterol, triglicerídeos, fructosamina, área sob as curvas glicêmica e de insulina, relação insulina/glicose e relação AUC insulina/AUC glicose nestes animais. A maioria dos cães obesos mostrou resistência periférica à ação da insulina, sendo considerados fortes candidatos para o desenvolvimento da síndrome metabólica, alteração ainda pouco estudada na espécie canina.

O primeiro artigo gerou importantes informações quanto ao papel da CRP no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina em cães. Diferente do que se pensava, os níveis de CRP foram menores nos cães obesos do que nos controles. A função desta proteína está intimamente relacionada com o processo inflamatório (DAS, 2001; KREBS & RODEN, 2004; FANTUZZI, 2005), que foi considerado um dos principais responsáveis por causar a resistência à insulina induzida pela obesidade (FLOREZ et al., 2005; FANTUZZI, 2005; MARCELL et al., 2005; PARK et al., 2005).

Embora não avaliado no presente estudo, os níveis de TNF- α em tecido adiposo de cães obesos se mostraram elevados em estudos anteriores (BLANCHARD et al., 2004), levando a se concluir que apesar de a obesidade estar associada à inflamação, a CRP deverá se comportar de forma diferenciada em cães. Isto faz com que esta proteína não se preste tanto para a avaliação da obesidade em cães como se presta para outras patologias (MURATA et al., 2004; PARRA et al., 2005), ou para previsão do risco do desenvolvimento da diabetes mellitus, como foi caracterizada em humanos (SJÖHOLM & NYSTRÖM, 2006), estando positivamente correlacionada com níveis glicêmicos basais (NAKANISHI et al., 2005).

Esta descoberta foi relatada pela primeira vez no presente estudo, de acordo com o conhecimento dos autores, instigando maiores investigações quanto à patogênese da resistência à insulina causada pela obesidade em cães. Outros estudos em humanos já haviam proposto limitações no uso da CRP como marcador geral de inflamação sistêmica, já que os níveis não decresceram com a melhora na sensibilidade à insulina, ficando claro que a relação entre CRP e resistência à insulina em humanos é independente da obesidade (McLAUGHLIN et al., 2002; MARCELL et al., 2005; ZAGORSKI et al., 2005). A explicação proposta para os achados do presente estudo

estão relacionadas ao efeito anti-inflamatório da insulina (DANDONA, 2007), e aos efeitos dos triglicerídeos (MARTÍNEZ-SUBIELA & CERÓN, 2005) e colesterol (NAKANISHI et al., 2005) sobre os níveis de CRP.

O segundo artigo trouxe achados interessantes sobre a mensuração de fructosamina como auxiliar no diagnóstico da resistência à insulina. Amplamente utilizada na avaliação de cães diabéticos, tanto no diagnóstico quanto na resposta ao tratamento (LOSTE & MARCA, 2001; BENNET, 2002), mas também em outras alterações, como glicosúria renal (THORENSEN & BREDAL, 1999). Esta proteína glicosilada, por não sofrer alteração com a hiperglicemia transitória (MARCA et al., 2000), apresenta vantagens sobre a mensuração de glicose, mas nunca foi avaliada na resistência à insulina causada pela obesidade em cães. Em humanos, todavia, o seu aumento foi associado à resistência à insulina com ausência de diabetes (SATHIYAPRIYA et al., 2006). Apesar de estudos anteriores demonstrarem o efeito inibidor da hiperlipidemia sobre a fructosamina (REUSCH & HABERER, 2001; BENNET, 2002) e níveis reduzidos desta proteína em indivíduos obesos (BROUSSOLLE, 1991), o presente estudo revelou que este indicador apresenta-se maior em cães obesos resistentes a insulina do que em obesos sensíveis a insulina, quando comparados aos controles não obesos. Desta forma, pode-se sugerir o seu uso em detrimento de técnicas mais dispendiosas e estressantes na investigação da suscetibilidade à diabetes mellitus em cães obesos.

A resistência periférica à insulina que ocorre com o desenvolvimento da obesidade manifesta-se principalmente nos tecidos muscular e adiposo branco, que são os principais locais relacionados ao metabolismo de carboidratos. Dos transportadores de glicose existentes no organismo, o GLUT4 está localizado principalmente nos mencionados tecidos (LIENHARD et al., 1992). Esta proteína sofre estimulação dependente de insulina, translocando-se do citosol para a membrana plasmática, onde participa da difusão de glicose para o meio intra-celular. O terceiro artigo permitiu que se avaliasse o comportamento de tal proteína nos tecidos adiposo e muscular de cães obesos e resistentes à insulina, podendo-se aliar as descobertas realizadas nos dois primeiros artigos a mecanismos moleculares de sinalização celular responsáveis pelo desenvolvimento da resistência à insulina induzida pela obesidade. A maioria dos estudos existentes avaliaram o efeito da administração exógena de insulina no transporte de glicose, não havendo relatos da estimulação da insulina endógena sobre tal parâmetro. Considerando-se que os animais estudados apresentavam hiperinsulinemia,

tal condição deveria estimular o transporte de glicose, mas o oposto foi verificado. Observou-se que a obesidade está associada à menor expressão de GLUT4, o que corroborou com estudos anteriores em cães (VARGAS et al., 2004), gatos (BRENNAN et al., 2004) e outras espécies (FRIEDMAN et al., 1992). O que não havia sido elucidado sobre a translocação dos transportadores na espécie canina foi atingido no presente experimento, onde se detectou, além de uma redução na migração de vesículas contendo a proteína para a superfície celular, concordando com estudos em ratos (LEDWIG et al., 2002), um aumento das vesículas intracelulares, o que propõe uma alteração ainda não revelada em estudos anteriores, podendo estar relacionada ao retorno de vesículas pré-existentes na membrana para o citoplasma, dificultando ainda mais o transporte de glicose nestes tecidos.

O presente estudo também pôde caracterizar um mecanismo distinto de translocação nos tecidos estudados, indo ao encontro de relatos em outras espécies (SERAPHIM et al., 2001). Puderam-se verificar alterações na expressão de GLUT4 no tecido adiposo relacionado à resistência à insulina, mas não no tecido muscular, podendo-se especular a respeito da maior implicação do primeiro no desenvolvimento da resistência à insulina causada pela obesidade em cães, em concordância com os relatos de Papa et al. (2002), em que camundongos obesos resistentes à insulina teriam diferente modulação no transporte de glicose do que os obesos sensíveis à insulina.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo trouxe algumas elucidações acerca da patogenia e achados laboratoriais em cães obesos resistentes à insulina, o que permitiu concluir-se que:

- Cães cuja obesidade foi naturalmente adquirida apresentam alta suscetibilidade à diabetes mellitus;

- Cães obesos apresentam alterações metabólicas coerentes com o desenvolvimento da síndrome metabólica, sendo fortes candidatos para tal;

- A proteína C-reativa apresenta limitações como marcador da inflamação decorrente da obesidade em cães, devendo ser utilizada com cautela na avaliação desta condição;

- A fructosamina se presta como parâmetro na avaliação da resistência à insulina causada pela obesidade em cães, podendo ser utilizada para tal finalidade;

- A obesidade contribui para a resistência à insulina em cães através de um defeito na translocação de GLUT4, possivelmente relacionada ao retorno de vesículas enriquecidas com a proteína da membrana plasmática para o interior das células;

- O tecido adiposo branco apresenta papel mais importante do que o tecido muscular no desenvolvimento da resistência à insulina causada pela obesidade em cães.

7 REFERÊNCIAS ADICIONAIS

APPLETON, D.J. et al. Insulin sensitivity decreases with obesity, and lean cats with low insulin sensitivity are at great risk of glucose intolerance with weight gain. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.3, n. 4, p. 211-228, 2001.

BAILHACHE, E. et al. Lipoproteins abnormalities in obese and insulin-resistant dogs. **Metabolism**, v. 52, n. 5, p. 559-564, 2003.

BAILHACHE, E. et al. An insulin-resistant hypertriglyceridaemic normotensive obese dog model: assessment of insulin resistance by the euglycaemic hyperinsulinaemic clamp in combination with the stable isotope technique. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 87, n. 3-4, p. 86-95, 2003.

BENNET, N. Monitoring techniques for diabetes mellitus in dogs and cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.17, n. 2 65-69, 2002.

BLANCHARD, G. et al. Rapid weight loss with a high-protein low-energy diet allows the recovery of ideal body composition and insulin sensitivity in obese dogs. **The Journal of Nutrition**, v.134, n. 8, p. 2148S-2150S, 2004.

BRENNAN, C.L. et al. GLUT4 but not GLUT1 expression decreases early in the development of feline obesity. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 26, p. 291-301, 2004.

BROUSSOLLE, C. et al. Evaluation of the fructosamine test in obesity: consequences for the assessment of past glycemic control in diabetes. **Clinical Biochemistry**, v. 24, n.2 p. 203-209, 1991.

BUTTERWICK, R. How fat is that cat? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 2, n. 2, p. 91-94, 2000.

CARCIOFI, A.C. et al. A weight loss protocol and owners participation in the treatment of canine obesity. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1331-1338, 2005.

CARVALHEIRA, J.B.C. et al. Vias de sinalização da insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, n. 4, p. 419-423, 2002

CINGOLANI, H.E. et al. **Fisiologia Humana de Houssay**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

COMAZZI, S. et al. Some aspects of erythrocyte metabolism in insulin-treated diabetic dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 72, p. 23-27, 2002.

DANDONA, P. et al. Anti-inflammatory effects of insulin. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 4, p. 511-517, 2007.

DAS, U.N. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 953-963, 2001.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n.5, p. 911-919, 2005.

FARIA, P.F. et al. Glicemia em cães obesos e senis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 47-50, 2005.

FELDHAHN, J.R. et al. Insulin sensitivity in normal and diabetic cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, n. 1, p. 107-115, 1999.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 422–441.

FLOREZ, H. et al. C-reactive protein is elevated in obese patients with the metabolic syndrome. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 71, n. 1, p. 92-100, 2006.

FRIEDMAN, J.E. et al. Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport and glucose transporter GLUT4. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 2, p. 701-705, 1992.

GARVEY, W.T.; et al. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n 11, p. 2377-2386, 1998.

GAYET, C. et al. The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes, in dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 3, p. 497-503, 2007.

GERMAN, A.J et al. A simple, reliable tool for owners to assess the body condition of their dog and cat. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 2031S-2033S, 2006.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997.

HERRTAGE, M.E. Management of Diabetes Mellitus. In: GORMAN, N. **Canine Medicine and Therapeutics**. 4ed. Malden: Blackwell Science, 1998.

HOENIG, M. Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1, p. 221-29, 2002.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

KANEKO, J.J. et al. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. New York: Academic Press, 1997.

KIM, S.P. et al. Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by isocaloric moderate-fat diet in the dog. **Diabetes**, v. 52, n. 10, p. 2453–2460, 2003.

KREBS, M.; RODEN, M. Molecular mechanisms of lipid induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, p. 1-12, 2004.

LAFLAMME, D.P. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice**, v. 22, n. 2, p. 10-15, 1997.

LEDWIG, D. et al. Early acarbose treatment ameliorates resistance of insulin-regulated GLUT4 trafficking in obese Zucker rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 445, n.1-2, p. 141-148, 2002.

LIENHARD, G.E. et al. How cells absorb glucose. **Scientific American**, p. 34-39, 1992.

LOSTE, A.; MARCA, M.C. Fructosamine and glycated haemoglobin in the assessment of glycaemic control in dogs. **Veterinary Research**, v. 32, n.1, p. 55-62, 2001.

- MARCA, M.C. et al. Effect of hyperglucaemia on serum fructosamine and blood glycated haemoglobin concentrations in canine samples. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n.1, p.11-16, 2000.
- MARCELL, T.J. et al. Exercise training is not associated with improved levels of C-reactive protein or adiponectin. **Metabolism**, v. 54, n. 4, p. 533-541, 2005.
- MARTIN, L.J.M. et al. Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 9, p. 355-360, 2006.
- MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J.J. Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anti-coagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A and ceruloplasmin assays. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, n. 7, p. 625-629, 2005.
- MASKELL, I.E.; GRAHAM, P.A. Endocrine Disorders. In: WLLS, J.M.; SIMPSON, K.W. **The Waltham Book of Clinical Nutrition of the Dog and Cat**. Great Britain: Butler & Tanner, 1994.
- MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.
- MAWBY, D.I. et al. Comparison of various methods for estimating body fat in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 2, p. 109-114, 2004.
- MAZZAFERRO, E.M. et al. Treatment of feline diabetes mellitus using an α -glucosidase inhibitor and a low-carbohydrate diet. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, n. 3, p. 183-189, 2003.
- McLAUGHLIN, T. et al. Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein. **Circulation**, v. 106, n. 23, p. 2908-2912, 2002.
- MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis**. 2 ed. USA: Saunders Company, 1998.
- MILLER, C.; et al. Tumor necrosis factor- α levels in adipose tissue of lean and obese cats. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2751S-2752S, 1998.
- MIURA, T. et al. Impairment of insulin-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle and adipose tissue in the Tsumura Suzuki obese diabetic mouse: a new genetic animal model of type 2 diabetes. **European Journal of Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 785-790, 2001.
- MURATA, H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.
- NAKANISHI, N. et al. Association between fasting glucose and CRP in a Japanese population: the Minoh study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 69, n. 1, p. 88-98, 2005.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994.
- PAPA, P.C. et al. GLUT 4 protein is differently modulated during development of

- PARK, H.S. et al. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α , and IL-6. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 69, n. 1, p. 29-35, 2005.
- PARRA, M.D. et al. Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. **Veterinary Research Communications**, v.30, n. 2, p. 113-126, 2006.
- PARSONS, S.E. et al. Endogenous serum insulin concentration in dogs with diabetic ketoacidosis. **Veterinary Emergency and Critical Care Society**, v. 12, n. 3, p. 147-152, 2002.
- PLIER, M.L. et al. Serum fructosamine concentration in nondiabetic and diabetic cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 27, n. 2, p. 34-9, 1998.
- PÖPPL, A.G.; GONZÁLEZ, F.H.D. Aspectos epidemiológicos e clinico-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 33-40, 2005.
- PRADHAN, A.D. et al. C-reactive protein, IL-6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **Journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 3, p. 327-34, 2001.
- REUSCH, C.E. & HABERER, B. Evaluation of fructosamine in dogs and cats with hypo- or hyperproteinaemia, azotaemia, hyperlipidaemia and hyperbilirubinaemia. **Veterinary Record**, v. 148, n. 12, p. 370-376, 2001.
- ROBERTSON, I.D. The association of exercise, diet and other factors with owner-perceived obesity in privately owned dogs from metropolitan Perth, WA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, n. 1, p. 75-83, 2003.
- RONDINONE, C.M.; et al. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 8, p. 4171-4175, 1997.
- SAAD, F.M.O.B. Programas de redução de peso para cães e gatos. **IV Simpósio sobre Nutrição de Animais de Estimação**. São Paulo: CBNA, p. 1-48, 2004.
- SATHIYAPRIYA, V. et al. Insulin resistance and enhanced protein glycation in men with prehypertension. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 12, p. 1457-1461, 2006.
- SERAPHIM, P.M. et al. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 10, p. 1353-1362, 2001.
- SIBERNAGL, S.; DESPOPOULOS, A. **Fisiologia: texto e Atlas**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- SIGULEM, D.M. et al. Obesidade na infância e na adolescência. In: **Compacta Nutrição**. São Paulo: EPM – Ed. de Projetos Médicos, 2000. 18 p.
- SJÖHOLM A.; NYSTRÖM T. Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. **Diabetes and Metabolism Research Reviews**, v. 22, n. 1, p.4-10, 2006.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Guanabara, 1996.
- THIESS, S. et al. Effects of high carbohydrate and high fat diet on plasma metabolite levels and on iv glucose tolerance test in intact and neutered male cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, n. 6, n. 4, p. 207-18, 2004.

THORENSEN, S.I.; BREDAL, W.P. Serum fructosamine measurement: a new diagnostic approach to renal glucosuria in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 67, n. 3, p. 267-271, 1999.

VARGAS, A.M. et al. Abnormal subcellular distribution of GLUT4 protein in obese and insulin-treated diabetic female dogs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 7, p. 1095-1101, 2004.

ZAGORSKI, S.M. et al. The effect of weight lost after gastric bypass on C-reactive protein levels. **Surgery for obesity and related diseases**, v.1, n. 2, p.81-85, 2005.

ZERBÉ, C.A. Proceedings of ESFM symposium at BSAVA Congress, 2001: What is so special about feline diabetes mellitus? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, n. 2, p. 99-103, 2001.


ANEXO 1 – Comprovante de aceitação do artigo 1 em revista científica

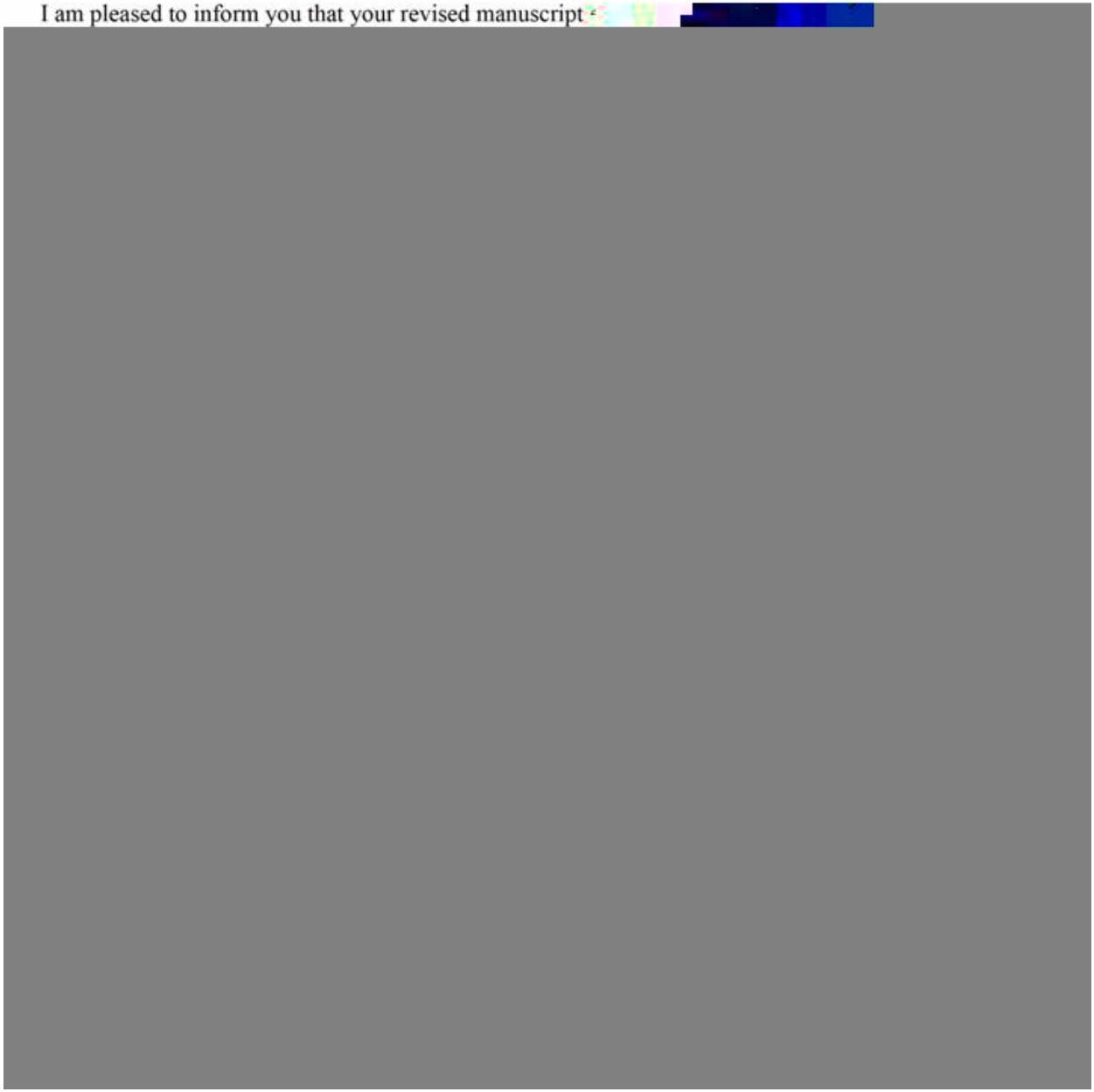
Angela Veiga

From: <editor@jvdi.org>
To: <angelavet@terra.com.br>; <felix.gonzalez@ufrgs.br>
Sent: sábado, 22 de setembro de 2007 23:50
Attach: _ Color-Figure-Agreement.pdf; _ Copyright-Transfer-Agreement.pdf
Subject: Journal of Veterinary Diagnostic Investigation - Decision on Manuscript ID07-0142.R4

22-Sep-2007

Dear Dr. Veiga:

I am pleased to inform you that your revised manuscript 



ANEXO 2 – Comprovante de submissão do artigo 2 a revista científica

CIÊNCIA RURAL**Revista Científica do Centro de Ciências Rurais****Universidade Federal de Santa Maria****CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS, BRASIL****e-mail: ciencia rural@mail.ufsm.br****homepage: <http://www.ufsm.br/ccr/revista>****<http://www.scielo.br/cr>****Fone: (55) 3220-8698 - Fax: (55) 3220-8695****ISSN 0103-8478**

Santa Maria, 11 de setembro de 2007.

Número do Artigo: 559/07**Título do Artigo:** A FRUCTOSAMINA COMO UMA FERRAMENTA NA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA EM CÃES OBESOS

Senhor(a) Pesquisador(a):

Acusamos o recebimento de seu artigo protocolo conforme número e título acima.

O mesmo encontra-se em tramitação.

Toda informação relativa ao mesmo deve ser acompanhada pelo número de referência e também poder ser feita na homepage da Revista.

Autor(es):

ÂNGELA PATRÍCIA MEDEIROS VEIGA, SIMONE TOSTES DE OLIVEIRA, ANDRÉA PIRES DOS SANTOS, PATRÍCIA RICK BARBOSA, FÉLIX HILÁRIO DIAZ GONZÁLEZ

Comentários:

Atenciosamente


Comissão Editorial

Ilmo.(a) Sr(a): ÂNGELA PATRÍCIA MEDEIROS VEIGA

UFRGS - LAB. ANÁLISES CLÍNICAS VET.


DEPT. DE PATOLOGIA E CLIN. VET.

AV. BENTO GONÇALVES, 9090

91540-000 - PORTO ALEGRE - RS

ANEXO 3 – Comprovante de submissão do artigo 3 a revista científica

JAPAN - Manuscript Proof



**Journal of
Animal Physiology and Animal Nutrition**

White adipose and muscular tissue insulin signaling in insulin-resistant obese dogs: differential GLUT4 translocational pattern

Journal:	<i>Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Veiga, Angela; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Clínica Veterinária González, Félix; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Clínica Veterinária de O. [REDACTED]

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)