GUILHERME DE LA PENHA CHIACCHIO FERNANDES

**Avaliação da frutossamina em cavalos com e sem resistência à
insulina**

SÃO PAULO

2017

GUILHERME DE LA PENHA CHIACCHIO FERNANDES

**Avaliação da frutossamina em cavalos com e sem resistência à
insulina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Profa. Dra. Carla Bargi Belli

SÃO PAULO

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgílio Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3474
FMVZ

Fernandes, Guilherme de la Penha Chiacchio
Avaliação da frutossamina em cavalos com e sem resistência à insulina / Guilherme
de la Penha Chiacchio Fernandes. – 2017.
49 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Carla Bargi Belli.

1. Resistência a insulina. 2. Equinos. 3. Diagnóstico. 4. Frutossamina. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da frutossamina em cavalos com e sem resistência à insulina", protocolada sob o CEUA nº 1242071116, sob a responsabilidade de **Carla Bargi Belli e equipe; Guilherme de La Penha Chiacchio Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 04/01/2017.

We certify that the proposal "Assessment of fructosamine in horses with and without insulin resistance", utilizing 30 Equines (30 males), protocol number CEUA 1242071116, under the responsibility of **Carla Bargi Belli and team; Guilherme de La Penha Chiacchio Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/04/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2016** a **02/2017**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 12 anos**

N: **30**

Linhagem: **Diversas raças**

Peso: **300 a 500 kg**

Resumo: A Resistência a insulina é tida como causa ou consequência de diversas enfermidades em equinos, dentre elas a síndrome metabólica equina e a laminite. Os testes até então estabelecidos para o diagnóstico para resistência a insulina são complexos e de alto custo em equinos. A frutossamina é uma proteína glicosilada utilizada no acompanhamento de pacientes com alterações no metabolismo de glicose e vem sendo apontada como potencial adjuvante no diagnóstico precoce da resistência a insulina. Propõem-se aqui testar esse potencial na espécie equina, dosando a frutossamina em dois grupos de equinos (com e sem resistência à insulina).

Local do experimento: **Fazenda São João**

São Paulo, 06 de janeiro de 2017

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERNANDES, Guilherme De La Penha Chiacchio

Título: **Avaliação da frutossamina em cavalos com e sem resistência à insulina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Wilson Roberto Fernandes e Rosana de la Penha Chiacchio Fernandes fontes de estímulo, carinho e amor que se fizeram sempre presentes não só durante esta jornada mas por toda a vida.

As minhas irmãs Heloisa de la Penha Chiacchio Fernandes e Thais de da Penha Chiacchio Fernandes, pelo companheirismo e paciência empregadas na convivência mais próxima de três figuras tão particulares e distintas.

Aos recém chegados sobrinhos Eduardo e Rafael, que me fazem lembrar que quando deixamos de lado os anseios pessoais as futuras gerações são a única razão para seguirmos em busca de um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos que voluntariamente se dispuseram a compor meu grupo de pesquisa e não só colaboraram mas sim possibilitaram a execução deste experimento.

Aos Professores ligados aos serviços de Clínica e Cirurgia de Equinos: Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Wilson Roberto Fernandes, Luis Claudio Lopes Correia da Silva, André Luís do Valle de Zoppa, Rodigo Romero Corrêa, Stefano Carlo Filippo Hagen e Aline Magalhaes Ambrósio, agradeço pela oportunidade de presenciar um trabalho que visa sempre a excelência.

Ao Médico Veterinário Contratado Júlio David Spagnolo e aos residentes, pelas conversas técnicas e recreativas que fizeram este período muito mais produtivo e prazeroso.

A Clara Satsuki Mori, técnica responsável pelo Laboratório de Bioquímica e Hematologia, pela disposição e solicitude.

A minha namorada Leticia Signori de Castro pelo companheirismo, “auxílio” no processamento das análises estatísticas e paciência que foram determinantes no cumprimento desta empreitada.

A minha amada mestra e orientadora professora Dr. Carla Bargi Belli pela paciência, dedicação e eficiência na contenção de surtos do seu orientado.

Aos funcionários do hospital veterinário Rosendo José Pires Neto, Gervásio Garcia da Silva, Felipe dos Santos Belau, José Antônio Lopes, Cícero Antônio da Silva e Marcos Roberto Rodrigues Alves, pelas piadas ruins, café das 7h e café das “aproximadamente” 14h que tornaram os dois últimos anos muito mais alegres.

“Este viandante não me é desconhecido, passou aqui há anos.

Chamava-se Zaratustra, mas mudou”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

FERNANDES, G.P.C. **Avaliação da frutossamina em cavalos com e sem resistência à insulina. [Evaluation of fructosamine in horses with and without insulin resistance]**. 2017. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A resistência à insulina é um problema cada vez mais presente na rotina clínica dos veterinários que trabalham com equídeos. A hiperinsulinemia resultante da resistência à insulina está associada a diversas alterações fisiológicas e podem levar a enfermidades graves como a Síndrome Metabólica Equina ou a Laminite que podem culminar na invalidez ou até morte do animal. O diagnóstico da resistência à insulina em equinos é baseado em modelos dos mesmos testes realizados em humanos. Até a presente data não há testes práticos, acessíveis e com sensibilidade e especificidade suficientemente capazes de diagnosticar a resistência à insulina em equinos. Em humanos e outros modelos animais a frutossamina é um biomarcador utilizado no diagnóstico da resistência à insulina. A dosagem de frutossamina sérica é simples e barata, porém, seu uso no diagnóstico da resistência à insulina em equinos ainda não foi testado. O presente estudo tem como objetivo avaliar a frutossamina em cavalos estabulados e sedentários diagnosticados com resistência à insulina por três diferentes métodos descritos em literatura sendo estes: Teste Combinado de Glicose e Insulina, Recíproco da Raiz Quadrada da Insulina (RRQI) e Relação Glicose-Insulina Modificada (RGIM). Além disso avaliamos a incidência de resistência à insulina em cavalos estabulados e sedentários. Todos os testes foram capazes de identificar grupos resistentes e não resistentes à insulina, porém com baixa concordância entre si. Apesar disso a dosagem de frutossamina sérica não diferiu entre os grupos formados a partir de qualquer um dos métodos diagnósticos de resistência à insulina.

Palavras-chave: Resistência à Insulina. Equinos. Diagnóstico. Frutossamina.

ABSTRACT

FERNANDES, G.P.C. **Evaluation of fructosamine in horses with and without insulin resistance.** [Avaliação da frutossamina em cavalos com e sem resistência à insulina]. 2017. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Insulin resistance is an increasing problem in the clinical routine of equine veterinarians. The hyperinsulinemia resulting from insulin resistance is associated with several physiologic alterations and can lead to serious diseases like equine metabolic syndrome or laminitis which can to early retirement or animal death. Equine insulin resistance diagnosis is based in human tests. Until now, there is no practical, accessible, sensible and specificity test capable of diagnosing equine insulin resistance. In human and other animals model, fructosamine is simple and cheap biomarker use in this diagnosis, however its use for equine insulin resistance diagnosis never had been tested. The aim of the present study was to evaluate the fructosamine in stable and sedentary horses diagnosed with or without insulin resistance by three different methods described in the literature (Combined Glucose and Insulin Test - TCGI, Reciprocal of the Square Root of Insulin (RISQI) and Modified Insulin-to-Glucose Ratio (MIRG). For this, 17 adult male horses were evaluated. All tests were able to identify resistant and not resistant to insulin animals, but with low concordance between them. Regardless of the test used, the serum fructosamine dosage did not differ between the resistant and non-insulin resistant groups and could not be used as an early marker for insulin resistance in horses.

Keywords: Insulin resistance. Equine. Diagnosis. Fructosamine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	INSULINA: BASES FISIOLÓGICAS	13
2.2	RESISTENCIA À INSULINA	15
2.3	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	18
2.3.1	Concentração sérica basal de glicose e insulina	19
2.3.2	Teste de tolerância a insulina	20
2.3.3	Teste de tolerância ao açúcar oral	20
2.3.4	<i>Clamp</i> hiperinsulinêmico euglicêmico	21
2.3.5	Modelo mínimo de glicose e insulina	22
2.3.6	Teste combinado de glicose e insulina	23
2.3.7	Dosagem de frutossamina sérica	24
2.3.8	Uso de proxies	25
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVOS	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	ANIMAIS	28
5.2	AVALIAÇÃO DE ESCORE CORPORAL	28
5.3	TESTE DE RESISTÊNCIA À INSULINA	30
5.3.1	Teste combinado de glicose e insulina	30
5.3.2	Proxies RRQI e RGIM	31
5.4	ANÁLISE DE AMOSTRAS	31
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
6	RESULTADOS	33
6.1	TESTE COMBINADO DE GLICOSE E INSULINA	33
6.2	ÍNDICE DE RRQI	37
6.3	ÍNDICE DE RGIM	37
6.4	CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES	38
7	DISCUSSÃO	39
8	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A insulina e seu efeito principal foram estabelecidos em 1921 quando foi isolada e purificada, desde então inúmeros grupos de pesquisa dedicam-se ao estudo de seus mecanismos moleculares e ação (WILCOX, 2005).

Tais estudos têm como objetivo não só a compreensão dos mecanismos e efeitos da insulina mas também seu envolvimento e relação com diversas enfermidades (CARVALHO; CARPINELLI, 2001).

A redução na produção de insulina e a redução da sensibilidade à insulina são as duas principais causas de alterações na homeostase de glicose em humanos. Em equinos a redução da sensibilidade ou resistência à insulina é notavelmente mais preocupante tendo em vista a baixa ocorrência da redução da produção de insulina e as graves consequências da hiperinsulinemia nesta espécie (MENDOZA et al., 2015).

O crescente aumento do número de cavalos diagnosticados com resistência à insulina e as enfermidades correlatas, principalmente a síndrome metabólica equina e a laminite, justificam a necessidade de estabelecer meios diagnósticos capazes de identificar a resistência à insulina nos estágios iniciais da doença, a fim de evitar tais complicações (FIRSHMAN; VALBERG, 2007).

A hiperglicemia é o principal estímulo para a produção e liberação de insulina. A duração desta hiperglicemia pode ser avaliada indiretamente através da dosagem de frutossamina em humanos, mas não se sabe se a frutossamina é ou não um possível marcador da hiperglicemia transitória associada a resistência à insulina em equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INSULINA: BASES FISIOLÓGICAS

A insulina é o hormônio anabólico mais importante no metabolismo energético em mamíferos. Ela é secretada pelo pâncreas e, entre outros efeitos, regula o metabolismo de glicose e de gordura (DUEHLMEIER et al., 2010).

A insulina é um dipeptídeo que contém cadeias A e B ligadas por pontes dissulfeto com 51 aminoácidos (WILCOX, 2005). A insulina equina difere da insulina porcina em apenas um aminoácido enquanto difere da humana na posição de dois aminoácidos (SOUZA et. al., 2007).

A secreção da insulina ocorre nas células β pancreáticas e é estimulada principalmente pela glicose circulante além de outros substratos energéticos metabolizáveis como os ácidos graxos livres (AGL). A glicose é transportada para o interior da célula β pela proteína integral Glut2 que possibilita um rápido transporte de glicose quando em concentração elevada no sangue (CARVALHO; CARPINELLI, 2001).

A estimulação das células β pela glicose ativa a fosfolipase C, promovendo a hidrólise de fosfolípidos de membrana gerando inositol 1-4-5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 e o DAG ativam os canais de cálcio localizados na membrana do retículo endoplasmático e membrana celular respectivamente, porém o IP3 promove a passagem de íon Ca^{2+} da organela para o citosol, e o DAG promove a passagem do meio extracelular para o intracelular, aumentando ainda mais a concentração deste íon no citosol. O DAG também ativa a proteína quinase C (PKC), que por sua vez, ativa proteínas dos grânulos secretórios de insulina que, juntamente com o Ca^{2+} , promovem a ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos responsáveis pela translocação desses grânulos para as proximidades da membrana plasmática e a consequente exocitose da insulina (WILCOX, 2005).

A segunda via capaz de estimular a secreção de insulina, também muito ativa, é a ação direta da insulina sobre as células β , a insulina tem portanto efeito autócrino estimulando os receptores de insulina da parede celular promovendo a

fosforilação do substrato sensível à insulina IRS1 ou IRS2 que tem ação direta sobre a membrana do retículo endoplasmático, e ainda ativa IP3 que também exerce ação sobre a membrana desta organela elevando a concentração de cálcio no citosol promovendo marginação dos grânulos secretórios e finalmente exocitose da insulina (SAH et al., 2016).

Uma terceira via merece destaque: as células β secretam insulina através do metabolismo de AGL. Assim como a glicose, os AGL promovem a secreção de insulina, porém apresentam um efeito modulatório tempo-dependente. Ilhotas de Langerhans isoladas de ratos aumentaram a produção de insulina quando expostas a altas concentrações de AGL entre 3 e 4 horas, porém reduziram a produção quando expostas as mesmas concentrações por 24 a 48 horas, provando desta forma o efeito modulatório dos AGL sobre a secreção de insulina mesmo quando esta é estimulada por outras vias. O mecanismo pelo qual os AGL estimulam ou inibem a secreção de insulina são pouco conhecidos mas este efeito pode ser induzido por fatores de transcrição tais como o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR) ou fator promotor de insulina (IDX-1) (CARVALHO; CARPINELLI, 2001).

Nas células alvo, a insulina liga-se aos receptores de insulina presentes na membrana celular. Estes receptores são glicoproteínas heterotetraméricas compostas de duas subunidades α (extracelular) e duas subunidades β (intracelular) ligadas por pontes dissulfeto. A insulina liga-se a subunidade extracelular resultando em uma mudança na conformação da proteína, permitindo que o ATP ligue-se à subunidade intracelular. Este processo permite a fosforilação do IRS que pode então ligar-se a outras moléculas de sinalização que medeiam as demais ações da insulina (WALLER et al., 2011).

Os tecidos musculoesquelético, adiposo e o fígado são particularmente sensíveis à insulina. Nestes tecidos a glicose pode ser metabolizada em energia, armazenada como glicogênio ou ainda convertida em gordura (SOUZA et al., 2007; FRANK, 2006).

A insulina atua em várias etapas do metabolismo dos carboidratos; a síntese de glicogênio é aumentada bem como a glicólise que resulta em ácido pirúvico que será utilizado no ciclo de Krebs para a produção de ATP (WILCOX, 2005).

Ela é também fundamental no metabolismo de lipídeos, estimulando a síntese de ácidos graxos no tecido adiposo, fígado e glândula mamária formando os

triglicerídeos armazenados posteriormente no próprio tecido adiposo e fígado. Isto se deve ao aumento da síntese de ácidos graxos pela ativação da fosforilação de acetil-CoA carboxilase, aumento da síntese de triglicérides, que por sua vez é estimulada pela esterificação do glicerol fosfato levando também ao aumento da síntese de colesterol (ANTU et al., 2016; KALARIA; SIRAJWALA; GOHEL, 2016).

Apesar de diversos estudos relatarem os principais efeitos fisiológicos mediados pela insulina, muitos mecanismos não são compreendidos por completo (FIRSHMAN; VALBERG, 2007).

2.2 RESISTÊNCIA À INSULINA

A importância da resistência à insulina (RI) é dada pela relação, em graus variados, com diversas outras enfermidades dos equinos, como a síndrome metabólica equina, disfunção da *pars* intermedia da hipófise, obesidade, hiperlipemia, diabetes mellitus, laminite, endotoxemia, tumor de células da granulosa e osteocondrite dissecante (FRANK, 2011).

A RI apresenta diferentes definições, como a redução da resposta tecidual à insulina endógena, acarretando em hiperinsulinemia associada à hiperglicemia ou normoglicemia, ou ainda resistência frente à insulina exógena (TORIBIO, 2010).

Ainda pode ser caracterizada pela falha na resposta tecidual à insulina, sendo consequência de diversos mecanismos, como a redução da densidade ou mau funcionamento de receptores de insulina na superfície celular, defeitos nas vias de sinalização interna e interferência na expressão ou translocação de proteínas GLUT4, responsáveis pela captação e transporte facilitado de glicose para o meio intracelular (FRANK, 2006).

O efeito biológico da insulina só é alcançado quando determinado número de receptores estiverem ocupados. Caso estes receptores não estejam funcionais, são necessárias maiores concentrações de insulina para que se atinja o efeito biológico, caracterizando desta forma a resistência à insulina ou a insensibilidade à insulina (DUNBAR et al., 2016).

O resultado destas alterações reflete-se clinicamente em hiperinsulinemia com normoglicemia (RI compensada) ou hiperinsulinemia com hiperglicemia (RI não compensada) (TORIBIO, 2010).

A dieta rica em carboidratos e a utilização de glicocorticoides reduzem a sensibilidade à insulina em cavalos. Este aumento da sensibilidade é documentado em equinos com miopatia por acúmulo de polissacarídeos ou doença do neurônio motor (DE LAAT et al., 2012).

Os mecanismos fisiopatológicos desta condição não foram estudados em equinos de forma específica. Sendo assim, grande parte do conhecimento sobre esta condição fisiológica alterada é inferido com base nos estudos em humanos e outros modelos animais (LACOMBE, 2014).

A ação da insulina é influenciada pela interação com outros hormônios, entre eles hormônio do crescimento, glucagon, glicocorticoides, além de catecolaminas. O glucagon estimula a glicogenólise, gliconeogênese e a cetogênese. A proporção entre insulina e glucagon determina a fosforilação ou desfosforilação de enzimas relevantes no metabolismo celular. As catecolaminas promovem lipólise e glicogenólise. Já os glicocorticoides, promovem o catabolismo muscular e gliconeogênese. O excesso destes hormônios pode contribuir com a resistência à insulina em condições específicas, mas não está relacionado a maioria dos quadros de RI em humanos (FIRSHMAN; VALBERG, 2007; WALLER et al., 2012).

Em modelos animais a RI é associada principalmente a defeitos na sinalização dos receptores de insulina ou ao excesso de regulação negativa causada pela interação com outros hormônios. Ainda é associada também a anormalidades nas proteínas IRS e IP3 ou a função e expressão das proteínas GLUT4 (ANNANDALE et al., 2004; DUEHLMEIER et al., 2010).

Apesar do tecido adiposo, músculo e cérebro serem particularmente dependentes e sensíveis à insulina, os efeitos e manifestações da RI também podem gerar alterações nos demais órgãos e sistemas (WILCOX, 2005).

O tecido muscular é particularmente dependente da insulina e responsável por 60-70% de toda a captação de glicose mediada pela insulina no organismo. Apesar de não depender da glicose ou glicogênio quando os níveis de insulina forem baixos, na RI a síntese de glicogênio é prejudicada, pois a translocação de glicose para o interior das células é insuficiente. Nestas condições o tecido muscular ativa outras vias para obtenção de energia a fim de manter o metabolismo celular,

incluindo o metabolismo de aminoácidos. Desta forma a RI apresenta um efeito catabólico no tecido muscular (FRANK et al., 2005).

No tecido adiposo a insulina estimula a absorção de glicose, promove a lipogênese, enquanto suprime a lipólise com o consequente influxo de ácidos graxos livres para a circulação. Na RI o aumento do fluxo dos ácidos graxos para o fígado promove a produção de lipoproteínas de baixíssima densidade (VLDL) enquanto a cetogênese permanece suprimida pela hiperinsulinemia, contribuindo para a hipertrigliceridemia observada nos quadros de RI (WILCOX, 2005; HUANG et al., 2016).

No tecido ósseo a insulina promove a síntese óssea por ação direta sobre osteoblastos. Além disto ela tem efeito inibitório sobre os osteoclastos. Tal fato foi demonstrado em osteoclastos cultivados de ratos e posteriormente transferidos para placas dentárias. A insulina mostrou efeito dose dependente na redução da destruição da matriz óssea. Estes efeitos ainda não foram testados em modelos de RI, porém a maior concentração de insulina nos animais sob estas condições pode afetar a síntese e remodelamento ósseo tendo em vista o efeito dose dependente apresentado (THOMAS; UDAGAWA; HARDS, 1998).

A RI ainda causa alterações no endotélio vascular por estar relacionada à produção de óxido nítrico. Não se sabe se a insulina está ligada diretamente à produção ou se está envolvida em mecanismos comuns à produção do óxido nítrico. O óxido nítrico é o principal fator que promove o relaxamento endotelial em grandes artérias, além de inibir a agregação plaquetária e a proliferação de células musculares lisas. Estes fatores têm especial relevância em humanos, pois predisõem a aterosclerose, estenoses, espessamento médio intimal e outras enfermidades vasculares e cardíacas (WHEATCROFT et al., 2005).

A hiperinsulinemia pode também levar a hipertensão por induzir a retenção de sódio e água nos túbulos renais, promover a proliferação de células musculares lisas e alterações no transporte transmembrana de íons. Estas alterações foram demonstradas em linhagens de ratos (SECHI, BARTOLI, 1996). Em estudos em humanos, a hipertensão é 45% mais relatada em pacientes obesos e com RI quando comparada a pacientes que apresentam apenas obesidade (ZANG et al., 2016).

A relação entre a RI e laminite em equídeos é bem documentada. Pôneis com laminite recorrente apresentam correlação positiva entre hipertensão e RI quando comparados ao grupo controle, porém estas alterações são encontradas com maior

frequência durante o verão, onde as pastagens contém maior quantidade de carboidratos (CARSLAKE et al., 2008).

Em estudo realizado por Karikoski et al. (2011), pouco mais de 89% dos cavalos apresentando laminite como sinal primário a desenvolveram em consequência de enfermidades metabólicas.

A RI, laminite e obesidade são alterações envolvidas na SME, assim denominada por Jhonson et al. (2002) por conta das semelhanças com a síndrome metabólica humana. A SME é um distúrbio ainda não completamente compreendido. Sabe-se que nesta condição estão presentes alterações vasculares e aumento do estresse oxidativo levando a um status pró-inflamatório, mas não se sabe se tais alterações são consequências ou ocorrem paralelamente aos prepostos da enfermidade. Fatores ambientais tais como dieta, nível de atividade física e estação do ano, e fatores intrínsecos, como genética, idade e escore de condição corporal podem predispor a SME.

2.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Inúmeros testes são descritos para a avaliação da RI em equinos, como teste de tolerância a insulina (TTI), teste de tolerância a glicose (TTG), teste do açúcar oral (TAO), concentração de insulina basal (CIB), modelo mínimo de glicose-insulina (MMGI) e o teste combinado de glicose e insulina (TCGI).

No cavalo, a RI tem fracas evidências diagnósticas, não sendo diagnosticada de forma quantitativa e específica por testes como insulina sérica, glicemia, intolerância a glicose (oral ou intravenosa), tolerância à insulina. Porém estes testes auxiliam no diagnóstico clínico (SUAGEE et al., 2011).

Apesar de não existir, até o momento, um teste simples que possa oferecer diagnóstico definitivo da RI, o clamp euglicêmico-hiperinsulêmico e o modelo mínimo da glicose-insulina são os mais completos pois são capazes de avaliar a liberação e consumo da insulina endógena. Porém tais testes têm elevado custo, o que os torna inviáveis para a prática veterinária (KRONFELD et al., 2005a).

2.3.1 Concentração sérica basal de glicose e insulina

Em humanos é frequente o uso da mensuração basal de glicose e insulina. Embora não seja uma forma específica de se determinar a resistência à insulina, este método fornece informações importantes que devem ser consideradas na avaliação clínica.

Alguns cavalos com RI apresentam níveis séricos basais de insulina e/ou de glicemia elevados. Porém, animais com uma RI leve ou identificada de forma precoce não apresentam quaisquer alterações nestes valores (FRANK, 2006).

A hiperglicemia pode indicar que há redução da resposta das células β à glicose ou redução da capacidade de captação da glicose pelos tecidos periféricos. Por sua vez, a hiperinsulinemia pode ocorrer quando há uma resposta compensatória das células β a resistência à insulina nos tecidos periféricos (COELHO et al., 2011).

A dosagem de insulina e glicemia é questionável quando estes forem isoladamente utilizados como testes diagnósticos da RI tendo em vista a grande variação destes valores nos indivíduos em um curto período de tempo (COELHO et al., 2011). Embora apresentem baixa sensibilidade, estes são os métodos mais simples de serem realizados, o que justifica sua utilização na rotina clínica a campo.

Outro aspecto a ser considerado é o método de dosagem e a diferença entre laboratórios que usam o mesmo método, já que tais particularidades podem dificultar a interpretação das informações (FRANK, 2006).

Devemos considerar como hiperinsulinemia animais que apresentem valores basais de insulina superiores a 30 $\mu\text{U/mL}$ (McGOWEN et al., 2008) ou 20 $\mu\text{U/mL}$ (FRANK, 2011). O intervalo fisiológico de glicemia para equinos em repouso está entre 80 – 110 mg/dL, devendo-se considerar valores superiores a 110 mg/dL como elevados (FRANK, 2011).

2.3.2 Teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à insulina (TTI) mensura a resposta glicêmica frente a uma determinada dose de insulina aplicada. Assim como os protocolos de outros testes, o TTI também apresenta variações da técnica que dificultam a comparação entre resultados, sendo que a dose de insulina utilizada vai de 0,2 a 0,6 UI/Kg (FIRSHMAN; VALBERG, 2007).

Dependendo da dose de insulina utilizada, o que se espera é que a glicemia caia a 50% da mensuração basal em 20 ou 30 minutos, e que regresse aos níveis basais entre 90 ou 120 minutos. Os animais resistentes à insulina respondem de maneira mais lenta a redução da glicemia ou, ainda, não atingem o nível de 50% do valor basal, além de ter um retorno aos valores iniciais mais rápido que os animais saudáveis (COELHO et al., 2011; DUNBAR et al., 2016).

O teste também apresenta resposta variável a inúmeros fatores como idade, dieta e estresse (FIRSHMAN; VALBERG, 2007).

2.3.3 Teste de tolerância ao açúcar oral (TTAO)

O TTAO é um método prático e muito utilizado na rotina clínica. Sua repetitividade e concordância com outros métodos de avaliação da RI são considerados baixos, porém a alta sensibilidade deste teste justifica a continuidade de seu uso (SCHUVER et al., 2014).

Existem inúmeras variações para o teste do açúcar oral. A mais utilizada preconiza um jejum de pelo menos 8 horas, coleta de amostras para a mensuração basal de glicose e insulina pela manhã e, em seguida, administração de 15 ml de glicose de milho para cada 100kg de peso vivo, e nova coleta de sangue para determinação de glicose e insulina aos 75 minutos após a administração da glicose. São considerados resistentes à insulina animais que apresentem valores de insulina superiores a 60 μ U/ml aos 75 minutos (FRANK, 2011; DUNBAR et al., 2016).

Outra variação também muito utilizada é a administração de glicose na dose de 1g/kg via sonda nasogástrica. A glicemia é mensurada antes e nos momentos 30,

60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração. O pico glicêmico deve ocorrer entre 90 e 120 minutos e os níveis de glicose devem voltar ao basal entre 4 a 6 horas. Um retardo da resposta glicêmica pode sugerir atraso no esvaziamento gástrico, diminuição da absorção ou ainda um aumento da sensibilidade à insulina. Por outro lado, a manutenção de níveis elevados de glicose por um período de tempo maior pode significar uma redução da função pancreática ou resistência à insulina (SCHUVER et al., 2014).

Fatores como o estresse causado pela sondagem nasogástrica, jejum, a idade dos cavalos, velocidade do esvaziamento gástrico e alterações de absorção podem interferir no resultado obtido neste teste (FIRSHMAN; VALBERG, 2007).

2.3.4 *Clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico

O *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico (CHE) é um dos testes mais recomendados para o diagnóstico da RI em equinos. Apesar de não obter valores sob condições fisiológicas, por ser um teste de desafio, é um teste objetivo capaz de avaliar a RI tecidual (FIRSHMAN; VALBERG, 2007; DUNBAR et al., 2016).

O procedimento inicia-se com a fixação de dois cateteres, um em cada veia jugular, sendo que um destes cateteres será utilizado para a infusão e outro para as coletas seriadas (ANNANDALE et al., 2004; FIRSHMAN; VALBERG, 2007).

Amostras de sangue para determinação de insulina e glicemia basais são colhidas e inicia-se uma infusão contínua de insulina na taxa de 3 μ U/min/kg, por 180 minutos. A glicemia é mensurada a cada 5 minutos e a taxa de infusão corrigida de forma que a glicemia permaneça em torno de 90 mg/dL, sendo corrigida sempre que a mensuração varie em 4 mg/dL. Amostras de sangue também são colhidas para a determinação de insulina (ANNANDALE et al., 2004; SUAGEE et al., 2011).

A captação de glicose estimulada pela insulina é calculada durante os 90 minutos finais do procedimento de acordo com a seguinte fórmula:

$$M = TIG - CS$$

Sendo M a captação de glicose, TIG a taxa de infusão de glicose (mg/kg/min) e CS a correção da glicose (mg/kg/min). A CS refere-se à correção da infusão de glicose feita em determinado intervalo de mensuração e é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$CS = (G1 - G0) \times 0.19 / \text{intervalo de tempo}$$

Sendo G1 e G0 a concentração de glicose antes e depois de determinado intervalo de tempo.

A concentração basal de insulina é calculada como a média das concentrações séricas de insulina medidas durante os 90 minutos finais do procedimento. O resultado é obtido considerando-se a concentração de insulina final menos a concentração basal de insulina obtidos antes do início do teste.

A sensibilidade é calculada através da fórmula:

$$SICLAMP = M / (\Delta I \times G)$$

Sendo M a captação de glicose estimulada pela insulina, ΔI a alteração na concentração de insulina, e G a concentração de glicose durante os 90 minutos do procedimento. Sendo assim, a sensibilidade à insulina é corrigida multiplicando-se pelo peso corporal (PRATT et al., 2014).

2.3.5 Modelo mínimo de glicose e insulina

O Modelo mínimo de glicose e insulina (MMGI) foi amplamente testado em humanos e outros modelos animais e apresentou alta correlação com o CHE, que é o único teste específico para a determinação da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina. O MMGI também apresentou boa correlação com o CHE em equinos, mas sua realização em situações clínicas é discutível por conta dos custos elevados relacionados principalmente à dosagem de insulina (CARSLAKE et al., 2016; DUNBAR et al., 2016).

A realização do teste é feita da seguinte forma: cinco minutos após a colheita de uma amostra para determinação das concentrações basais de insulina e glicose, é infundida uma solução de glicose 50% na dose de 0,3g/kg. A insulina, na dose de 0,015 U/kg, é injetada por via intravenosa 20 minutos após a infusão da glicose. A determinação da concentração plasmática de glicose é realizada nos momentos: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150 e 180 minutos após a administração de glicose. Amostras de sangue para a determinação de insulina sérica são obtidos nos momentos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 19, 22, 24, 30, 40, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos.

Os resultados obtidos são analisados por computador através de um algoritmo “modelo mínimo de análise”.

2.3.6 Teste combinado de glicose e insulina

O teste combinado de glicose e insulina (TCGI) é prático e capaz de fornecer informações quanto a dinâmica de glicose e insulina e ainda a interação entre estas variáveis (JHONSON, 2011), sendo desenvolvido a fim de refinar o diagnóstico de pacientes humanos com resultados inconclusivos frente aos testes de tolerância à glicose e tolerância à insulina por apresentarem valores marginais (EILER et al., 2005).

Devido à alta complexidade e custo de testes mais específicos, o TCGI é o mais comumente utilizado na rotina clínica em equinos (BROJER et al., 2011). Apesar de ser um teste dinâmico, o TCGI não fornece mensurações quantitativas e específicas quanto a resistência à insulina dos tecidos periféricos. Ainda assim é altamente recomendado por não requerer estrutura laboratorial no local de sua aplicação, ser facilmente interpretado e fornecer informações quanto a resposta glicêmica e insulinêmica simultaneamente (FRANK et al., 2010).

Apesenta, assim como outros testes, variações metodológicas, podendo conter de duas a dezoito análises de insulina e de catorze a dezoito análises de glicemia. Estas variações são explicadas pelas diferentes situações em que o teste foi aplicado experimentalmente, sendo o modelo mais simples, suficiente para o diagnóstico de RI em equinos.

Como resultado final do teste são obtidas as curvas glicêmica e insulinêmica. São considerados positivos para o TCGI os animais que, aos 45 minutos após a infusão da dextrose e insulina, apresentarem glicemia acima da mensurada no momento 0 ou apresentarem valores de insulina superiores a 100 $\mu\text{U/mL}$ (EILER et al., 2005; BROJER et al., 2011).

2.3.7 Dosagem de frutossamina sérica

A frutossamina é uma cetoamina formada a partir da ligação de um carboidrato com proteínas presentes no soro, sendo a albumina a principal delas. Em concentrações normais, as proteínas e aminoácidos não tem grande afinidade química com carboidratos. Porém, quando os carboidratos encontram-se em concentrações aumentadas, fazem uma ligação estável com as proteínas através da reação de Maillard, formando então a frutossamina. A mensuração sérica de frutossamina é simples, rápida e de baixo custo (LEE, 2015).

A mensuração da frutossamina é utilizada em pacientes com alterações glicêmicas e reflete o controle glicêmico de um período de 15 a 21 dias e apresenta boa correlação com as flutuações pós prandiais de glicose, porém seu uso no diagnóstico precoce dos distúrbios glicêmicos ainda não foi estabelecido (LEE, 2015).

Em humanos os valores de frutossamina precisam ser corrigidos pelo valor da albumina caso haja evidências de hipoproteinemia. Nestas situações pode haver uma menor formação de frutossamina por conta da menor concentração de proteína total circulante.

Em equinos, o principal estímulo para a liberação da insulina é a hiperglicemia, porém não se sabe até então qual o grau e duração da hiperglicemia que são necessários para que se tenha uma resposta insulinêmica exacerbada (LAAT et al., 2012). Em humanos e cães o uso da frutossamina como biomarcador para o diagnóstico das alterações glicêmicas é frequente (KALARIA; SIRAJWALA; GOHEL, 2016), já em equinos sua utilização ainda não foi estabelecida em cavalos com RI. É esperado um aumento na dosagem sérica de frutossamina em decorrência da hiperglicemia pós prandial prolongada.

2.3.8 Uso de *proxies*

Treiber e colaboradores (2005) criaram um software específico com resultados do teste MMA obtidos em pôneis a fim de estabelecer um modelo matemático. Esse modelo permite que se desenvolvam equações a partir de diferenças entre grupos baseado nos valores basais de glicose e insulina. A essas equações se denominam *proxies* (BORER, et. al, 2012).

Sendo assim, dois modelos matemáticos foram criados e chamados de “recíproco da raiz quadrada da insulina” $RRQI = (1/\sqrt{\text{insulina}})$ e “relação glicose-insulina modificada” $RGIM = [800 - 0.30 \times (\text{INS} - 50)^2] / (\text{GLU} - 30)$.

Para RRQI são considerados os valores acima de 0.32 como normais, inferiores a 0.32 como resistente à insulina e inferiores a 0.22 como grave resistência à insulina.

Para RGIM são considerados resistentes à insulina valores superiores a 5.6. Porém não deve ser aplicada a cavalos com valores de glicose superiores a 100mg/dL

Apesar de serem métodos indiretos de avaliação da RI, os índices RRQI e RGIM podem ser úteis quando não houver condições para a realização de outros métodos diagnósticos ou quando for necessária a avaliação de uma grande população (PRATT et al., 2009).

3 HIPÓTESE

Existe diferença na dosagem de frutossamina sérica relacionada a hiperglicemia pós prandial transitória em cavalos com e sem resistência à insulina.

4 OBJETIVOS

Objetivo primário

O presente estudo tem como objetivo avaliar se a dosagem de frutossamina pode auxiliar no diagnóstico precoce da resistência à insulina em equinos.

Objetivo secundário

Estabelecer a ocorrência de resistência à insulina em cavalos com sobrepeso, estabulados e sem atividade física.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados vinte cavalos machos não castrados, adultos (entre oito e quatorze anos), de várias raças (6 crioulos, 4 árabes e 10 quarto de milha), com escore corporal entre 6 e 8 conforme critérios estabelecidos por Henneke et al. (1983), em regime de estabulação permanente sem exercer qualquer atividade física.

Tais animais foram selecionados em um haras na região de Campinas-SP e submetidos a exame físico e coleta de amostra de sangue por venopunção jugular. O sangue foi separado em duas alíquotas, sendo uma delas acondicionada em um tubo com EDTA e outra em um tubo seco. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bioquímica e Hematologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram realizados exames bioquímicos e hemograma a fim de atestar a sanidade dos animais.

Foram incluídos no experimento apenas os cavalos machos saudáveis frente ao exame clínico, hematológico e bioquímico renal e hepático e que durante as coletas não apresentaram alterações de comportamento compatíveis com estresse.

5.2 AVALIAÇÃO DE ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

O escore corporal (ECC) foi avaliado segundo a classificação dada por Henneke (1983), que estabeleceu uma escala de 1 a 9 para esta avaliação, sendo:

1 (emaciado) - Animal extremamente emaciado. Processos espinhosos, costelas, inserção da cauda, estruturas da garupa e projeção do ísquio proeminentes. Estruturas ósseas da cernelha, ombros e pescoço facilmente visíveis. Tecido adiposo não palpável.

2 (muito magro) - Animal emaciado. Fina camada de gordura cobrindo a base dos processos espinhosos, processos transversos das vértebras lombares arredondadas. Processos espinhosos, costelas, inserção da cauda, estruturas da garupa e projeção do ísquio proeminentes. Estruturas ósseas da cernelha, ombros, e pescoço facilmente observadas.

3 (magro) - Gordura cobrindo cerca de metade dos processos espinhosos, processos transversos não são palpáveis. Inserção da cauda proeminente, porém as vértebras não são mais observadas individualmente. Estruturas da garupa arredondadas, entretanto facilmente observadas. Projeção do ísquio não visível. Costelas, ombros e pescoço acentuados.

4 (moderadamente magro) - Sulco ao longo da região lombar. Linha das costelas visível. Gordura pode ser palpada na inserção da cauda de acordo com a conformação do animal. Estruturas da garupa não são visíveis. Costelas, ombros e pescoço não são facilmente visíveis.

5 (moderado) - Costelas não são observadas, porém facilmente palpáveis. Gordura na região da inserção da cauda começa a se tornar macia. Cernelha arredondada sobre os processos espinhosos. Ombros e pescoço ligados suavemente ao corpo do animal.

6 (moderadamente gordo) - Pode haver pequena depressão na linha dorsal. Gordura sobre as costelas se torna macia. Gordura na região da inserção da cauda se torna macia. Gordura começa a ser depositada ao longo da cernelha, atrás dos ombros e ao longo do pescoço.

7 (gordo) - Pode haver uma depressão na linha dorsal. Costelas podem ser individualmente palpáveis, porém, é possível sentir gordura entre elas. Gordura na região da inserção da cauda se torna macia. Gordura depositada ao longo da cernelha, atrás dos ombros e ao longo do pescoço.

8 (obeso) - Depressão na linha dorsal. Dificuldade para palpar as costelas. Gordura na região da inserção da cauda é muito macia. Região próxima à cernelha preenchida com gordura. Visível aumento na espessura do pescoço. Gordura depositada nas nádegas.

9 (muito obeso) - Acentuada depressão na linha dorsal. Gordura macia sobre as costelas. Dobras de gordura na região de inserção da cauda, ao longo da cernelha, atrás dos ombros e ao longo do pescoço. Gordura ao longo da parte interna das coxas. Flanco preenchido com gordura.

5.3 TESTES DE RESISTÊNCIA À INSULINA

Os animais foram submetidos a três testes para determinação da presença ou não da resistência à insulina.

5.3.1 Teste combinado de glicose e insulina (TCGI)

Este teste foi realizado de acordo com o estabelecido por Eiler et al. em 2005.

Dois cateteres foram inseridos, um em cada veia jugular e fixados. Por um dos cateteres foi realizada a infusão rápida de 150mg/kg de dextrose a 50%. Imediatamente após este procedimento uma seringa contendo 0,1 UI/kg de insulina regular diluída em 3 ml de solução fisiológica foi administrada em bolus.

O segundo cateter foi utilizado para a coleta seriada do sangue nos momentos: 0 (antes da infusão) e 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 minutos a partir da infusão.

Em todos os momentos de coleta supramencionados a glicemia foi avaliada. Nos momentos 0 e 45 minutos a insulina também foi mensurada.

No momento 0 ainda foram mensurados frutossamina, e a proteína total.

Foram considerados positivos para o teste e, portanto, portadores de resistência à insulina, animais que aos 45 minutos apresentaram valores de glicemia acima do basal ou insulinemia superior a 100 μ U/mL.

No momento 0 ainda foram também mensurados os triglicerídeos, a proteína total e a frustosamina.

5.3.2 Proxies RRQI e RGIM

Os valores basais de glicose e insulina foram inseridos nos modelos matemáticos RRQI e RGIM conforme estabelecido por Treiber e colaboradores (2005).

5.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

A glicose foi mensurada pelo método glicose oxidase/peroxidase (GOD-PAP) em analisador bioquímico Diasys : Holzheim – Alemanha utilizando o kit Glicose - Marca Diasys – Produto: 1 2500 99 10 023.

A frutossamina foi mensurada pelo método NBT (azul de nitrotetrazolio) em analisador bioquímico Biosystems: Barcelona - Espanha utilizando o kit Frutossamina – Marca Biosystems – Produto: 11046.

Os triglicerídeos foram mensurados pelo método glicerol fosfato oxidase/peroxidase em analisador bioquímico Biosystems: Barcelona – Espanha utilizando o kit Triglicérides: Marca Biosystems – Produto: 11528.

As proteínas totais foram mensuradas pelo método Biureto em analisador bioquímico Labtest: Lagoa Santa – Brasil utilizando o kit Proteína Totais – Marca Labtest – Produto: 99.

A insulina foi mensurada pelo método de radioimunoensaio utilizando o kit comercial Insulina - HI-14K Merck-Millipore – Darmstadt, Alemanha e contador gamma Wizard 2 - Perkin Elmer.

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Hematologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com exceção da avaliação da insulina, realizada no laboratório PROVET.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cavalos foram divididos em dois grupos: não resistente (NR), no qual os animais não apresentaram resistência á insulina; e resistente (R), no qual os animais foram diagnosticados como resistentes à insulina dependendo do teste aplicado.

Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias e caso estas premissas não fossem obedecidas, os dados foram transformados. Para análise estatística foi utilizado o programa SAS 9.3 (*Statistical Analysis System*). As variáveis glicemia, insulina, frutossamina, proteína total, idade, tempo de estabulação e escore de condição corporal (ECC), avaliadas nos grupos não resistente e resistente à insulina, nos tempos 0 e 45 minutos, foram analisadas pelo procedimento PROC GLM para o modelo fatorial 2x2, considerando o efeito de fator grupo (não resistente x resistente), o efeito de fator tempo (0 x 45 minutos) e a interação entre grupo x tempo. Para as variáveis resposta que apresentaram efeito de interação, foi realizado o pós-teste de Tukey para verificar quais grupos diferiram entre si.

Com relação à curva glicêmica, os dados de glicemia foram analisados pelo procedimento PROC GLM para o modelo de medidas repetidas no tempo, considerando novamente o efeito de grupo, tempo e interação entre grupo x tempo. Na presença de interação, foi realizado o pós-teste de Tukey entre o grupo não resistente e resistente dentro de cada tempo (0, 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60 e 75 minutos). Por fim, foi realizado uma análise de correlação de Pearson pelo procedimento PROC CORR para verificar possíveis correlações entre as variáveis analisadas dentro do grupo não resistente e do grupo resistente. Foi considerado um p significativo quando $< 0,05$.

6 RESULTADOS

Após aplicados os critérios de inclusão e divisão dos grupos, foram totalizados 17 equinos, sendo a distribuição nos grupos variável conforme o teste aplicado.

6.1 TESTE COMBINADO DE GLICOSE E INSULINA

Na comparação entre animais não resistentes (NR) e resistentes à insulina (R), não houve efeito de grupo, tempo ou interação entre grupo e tempo para as dosagens de frutossamina e proteína total (Tabela 1 e 2) e para o índice RIQSI e MIRG calculados com base das concentrações basais de glicose e insulina (tempo 0). Houve diferença para a idade e tempo de estabulação entre os grupos, sendo que o grupo não resistente apresentou menores valores para ambos os parâmetros.

Tabela 1 - Média, desvio padrão e valores de p das avaliações dos grupos não resistentes (NR) e resistente à insulina (R) - São Paulo - 2017

	NR	R	Valor de p
Frutossamina (mg/dL)	319.6 ($\pm$ 48.89)	308.85 ($\pm$ 53.34)	0.51
Proteína total (mg/dL)	6.55 ($\pm$ 0.46)	6.77 ($\pm$ 0.38)	0.14
Idade (anos)	9.6 ($\pm$ 1.89)	11.57 ($\pm$ 1.71)	0.04
Tempo de estabulação (anos)	2.9 ($\pm$ 0.73)	4.71 ($\pm$ 0.95)	0.0005
ECC (1-9)	7.3 ($\pm$ 0.82)	4.14 ($\pm$ 0.69)	0.68
RIQSI	0.39 ($\pm$ 0.23)	0.31 ($\pm$ 0.09)	0.41
MIRG	6.1 ($\pm$ 2.36)	4.9 ($\pm$ 0.79)	0.21

Tabela 2 - Média, desvio padrão e valores de p das avaliações nos tempos 0 e 45 minutos - São Paulo - 2017

	0	45	Valor de p
Frutossamina (mg/dL)	326.64 ($\pm$ 58.13)	303.23 ($\pm$ 39.32)	0.12
Proteína total (mg/dL)	6.67 ($\pm$ 0.52)	6.61 ($\pm$ 0.35)	0.51

Já para a dosagem de glicemia e insulina, houve efeito de interação entre grupo e tempo ($p < 0.0001$). No caso da dosagem de glicemia, as médias do grupo não resistente (79.9 ± 6.73 mg/dL) e resistente (89.14 ± 13.52 mg/dL) no tempo 0 foram iguais, diferindo aos 45 minutos, momento no qual o grupo não resistente apresentou uma queda da dosagem glicêmica (46.42 ± 10.35 mg/dL), enquanto o grupo resistente apresentou elevação da glicemia (107.71 ± 18.11 mg/dL) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Dosagem de glicemia do grupo não resistente (NR) e resistente à insulina (R) nos tempos 0 e 45 minutos - São Paulo - 2017

Para dosagem de insulina também houve efeito de interação entre grupo e tempo semelhante a dosagem de glicemia ($p = 0.042$). No tempo 0, as médias do grupo não resistente (10.11 ± 6.66 μ U/mL) e resistente (8.23 ± 1.66 μ U/mL) foram iguais. Aos 45 minutos, houve um aumento da insulina no grupo não resistente (51.23 ± 20.73 μ U/mL) quando comparado ao tempo 0, entretanto este aumento foi mais evidente no grupo resistente (79.36 ± 34.84 μ U/mL) que diferiu estatisticamente ($p = 0,003$) aos outros tempos de avaliação (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Dosagem de insulina do grupo não resistente (NR) e resistente à insulina (R) nos tempos 0 e 45 minutos - São Paulo - 2017

Na análise da curva glicêmica, houve diferença entre o grupo não resistente e resistente nos tempos 5, 15, 25, 35, 45 e 75 minutos, sem diferença no começo e no final da curva, ou seja, nos tempos 0, 1 e 75 minutos (Tabela 3 e gráfico 3).

Tabela 3 - Média, desvio padrão, n amostral e valores de p para curva glicêmica (mg/dL) dos grupos não resistente (NR) e resistente à insulina (R) - São Paulo - 2017

Tempos (minutos)	Grupos		Valor de p
	NR	R	
0	79.7 (± 6.73) n=10	89.14 (± 13.52) n=7	0.07
1	225.7 (± 29.62) n=10	244.28 (± 21.97) n=7	0.17
5	175.4 (± 26.23) n=10	206.28 (± 16.40) n=7	0.01
15	111.77 (± 18.53) n=9	159.14 (± 19.22) n=7	0.0003
25	70.1 (± 18.35) n=10	130.28 (± 14.38) n=7	<0.0001
35	51.6 (± 16.93) n=10	118.42 (± 16.93) n=7	<0.0001
45	46.42 (± 10.35) n=7	107.71 (± 18.11) n=7	<0.0001
60	49.66 (± 15.56) n=3	96.85 (± 17.77) n=7	0.0027
75	56.5 (± 23.33) n=2	87.57 (± 16.90) n=7	0.055

Gráfico 3 - Dosagem de glicemia do grupo não resistente (NR) e resistente á insulina (R) ao longo do tempo (curva glicêmica) - São Paulo - 2017

Na análise de correlação, dentro do grupo não resistente, houve correlação negativa apenas entre a dosagem de glicemia e insulina. No grupo resistente, a correlação entre estas mesmas variáveis foi positiva e, além desta, houve correlação negativa entre a dosagem de frutossamina e insulina, e proteína total e glicemia (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de correlação entre as variáveis avaliadas - São Paulo - 2017

	Gli	Insulina	Fruto	Pt total
Gli		-0.82	ns	ns
Insulina	0.63		ns	ns
Fruto	ns	-0.59		ns
Pt total	-0.59	ns	ns	

Legenda: Células brancas = grupo não resistente; células cinza = grupo resistente; Gli = glicemia; Fruto = frutossamina e Pt total = proteína total. ns = não significativo

6.2 ÍNDICE DE RRQI

Na comparação entre animais não resistente (NR) e resistentes à insulina (R), separados pelo índice de RRQI, não houve efeito de grupo para dosagem de frutossamina, idade, tempo de estabulação e escore de condição corporal (ECC) (Tabela 5).

Tabela 5 - Média, desvio padrão e valores de p das avaliações dos grupos não resistente (NR) e resistente à insulina (R) divididos de acordo com o índice RRQI - São Paulo - 2017

	NR	R	Valor de p
Frutossamina (mg/dL)	332.10 ($\pm$ 31.99)	318.85 ($\pm$ 85.76)	0.65
Idade (anos)	10.4 ($\pm$ 2.45)	10.42 ($\pm$ 1.39)	0.97
Tempo de estabulação (anos)	3.8 ($\pm$ 1.39)	3.42($\pm$ 0.97)	0.55
ECC (1-9)	7.2 ($\pm$ 0.78)	7.28 ($\pm$ 0.75)	0.82

6.3 ÍNDICE DE RGIM

Na comparação entre animais não resistente (NR) e resistentes à insulina (R) separados pelo índice de RGIM, não houve efeito de grupo para dosagem de frutossamina, idade, tempo de estabulação e escore de condição corporal (ECC) (Tabela 6).

Tabela 6 - Média, desvio padrão e valores de p das avaliações dos grupos não resistente (NR) e resistente à insulina (R) divididos de acordo com o índice RGIM - São Paulo - 2017

	NR	R	Valor de p
Frutossamina (mg/dL)	332.28 ($\pm$ 31.14)	322.7 ($\pm$ 72.93)	0.74
Idade (anos)	10.28 ($\pm$ 2.42)	10.5 ($\pm$ 1.84)	0.83
Tempo de estabulação (anos)	3.85 ($\pm$ 1.46)	3.5 ($\pm$ 1.08)	0.57
ECC (1-9)	7.28 ($\pm$ 0.75)	7.2 ($\pm$ 0.78)	0.82

6.4 CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES

Os testes diagnósticos usados neste experimento apresentaram baixa concordância e nenhum cavalo foi considerado resistente à insulina pelos três métodos. Houve apenas concordância de casos negativos (não resistentes à insulina). A porcentagem de concordância entre as diferentes combinações de testes foram:

- TCGI – RRQI – RGIM: 17,64%
- TGCI – RRQI: 47%
- TCGI – RGIM: 23,5%
- RRQI – RGIM: 64,7 %

7 DISCUSSÃO

Por tratar-se de um estudo transversal, todas as coletas de um mesmo animal foram realizadas na mesma ocasião, de maneira que as correlações estatísticas pudessem ser realizadas. Dos vinte animais previamente selecionados, três foram excluídos sendo dois por apresentaram alterações hematológicas e um por apresentar comportamento compatível com estresse excessivo durante a realização dos testes.

Entre os dezessete animais que foram mantidos no experimento, sete foram identificados como positivos segundo o TCGI e, portanto, portadores de RI segundo os critérios descritos por diversos autores (EILER et al., 2005; FRANK, 2010; FUNK et al., 2012; PRATT, 2014). Nestes estudos são considerados positivos animais que aos 45 minutos de teste apresentam valores glicêmicos acima dos basais ou insulinemia superior a 100 $\mu\text{U/mL}$.

Destes animais, seis (86%) foram positivos por apresentarem valores glicêmicos acima dos basais aos 45 minutos e um (14%) por apresenta insulinemia superior a 100 $\mu\text{U/mL}$. Nenhum animal foi classificado como positivo por ambos os critérios. Na literatura não há dados de quantos animais são considerados positivos por se enquadrarem em cada um dos critérios do teste.

Segundo Brojer (2013), a curva glicêmica apresenta baixa repetibilidade nos indivíduos quando testada em curtos intervalos de tempo ou quando avaliada em situações de estresse como o transporte, por exemplo, porém os valores de insulina não apresentaram variação, o que pode indicar que a insulinemia é um critério mais confiável. Em contrapartida, Funk et al. (2012) avaliou possíveis alterações sazonais nas curvas glicêmicas e insulinêmicas em cavalos sadios e idosos, e ambas não tiveram variações durante o ano.

Durante o TCGI, ambos os grupos obtiveram valores basais de glicose e insulina estatisticamente semelhantes (glicose: $R = 89,14 \pm 13,52 \text{ mg/dL}$ e grupo C = $79,7 \pm 6,7 \text{ mg/dL}$; insulina: $R = 8,23 \pm 1,66 \mu\text{U/mL}$ e C = $10,11 \pm 6,66 \mu\text{U/mL}$). Estes dados são compatíveis com os relatos de outros estudos (FRANK, 2006; SOUZA et al., 2007; JHONSON, 2011; CHRISTOFFERSEN, 2009), que afirmam que apenas a mensuração das concentrações basais de glicose e insulina não são suficientes para o diagnóstico da RI em equinos ou outros modelos animais.

A insulina também foi avaliada aos 45 minutos do TCGI. Apesar deste critério ter sido determinante no diagnóstico de apenas um dos animais, a comparação dos valores referentes aos grupos diferiu estatisticamente ($C = 51,23 \pm 20,73 \mu\text{U/mL}$; $R = 79,63 \pm 34,84 \mu\text{U/mL}$). Mesmo assim não é possível estabelecer um valor de corte para esta variável que auxilie no diagnóstico da RI pois o desvio padrão aponta uma grande intersecção dos valores.

A curva glicêmica mostra também que não há diferença estatística no momento 0 e 1, tendo em vista que no momento 0 os animais apresentaram valores semelhantes e as doses de dextrose e insulina infundidas foram as mesmas. Era esperado que no primeiro momento os valores fossem realmente semelhantes, porém há uma notável diferença nos valores de glicose entre os momentos 5 e 60. Esta diferença marcante pode ser explicada pelo fato de 9 dos 10 animais do grupo C terem se mostrado sensíveis à insulina a ponto de não completarem o teste por apresentarem glicemia inferior a 40 mg/dL. Três animais tiveram o teste interrompido aos 35 minutos, quatro outros aos 45 minutos, um aos 60 minutos, e um aos 75 minutos. Não há relatos na literatura apontando quantos animais não resistentes à insulina completam o teste.

A hipoglicemia pode causar fasciculações, sudorese e até síncope e está entre as possíveis complicações encontradas durante o TCGI (FRANK, 2006; SOUZA et al., 2007; JHONSON, 2011; DUNBAR et al., 2016). Entre os 17 animais testados dois apresentaram intensa sudorese. Estes estavam entre os mais sensíveis, sendo que um teve o teste interrompido aos 35 minutos e outro aos 45 minutos. O protocolo de resgate dos animais que apresentaram hipoglicemia consta na literatura e preconiza a aplicação de uma dose extra de 180 ml de dextrose 50%, sendo que tal protocolo foi eficiente na reversão da hipoglicemia de todos os nove cavalos do experimento e das manifestações apresentadas por estes dois animais em particular.

Tendo em vista que o TCGI, assim como os demais testes dinâmicos, é uma adaptação do realizados em humanos, não é interessante que um teste diagnóstico seja causador de hipoglicemia em mais da metade dos que são submetidos a ele. Dunbar e colaboradores (2016) compararam o TCGI com o MMA e concluíram que o TCGI tem boa especificidade, porém uma sensibilidade abaixo do ideal. Neste cenário podemos inferir que a dose de insulina utilizada no teste possa ser reduzida, fazendo com que os valores de glicemia mantenham-se elevados por um período

maior, aumentando assim a sensibilidade do teste e reduzindo o número de animais que apresentam hipoglicemia.

Apesar disso, podemos notar uma marcante diferença para os valores de glicose entre os animais considerados resistentes e não resistentes para o TCGI.

Na análise de correlação apresentada, apenas a dosagem de glicose e insulina foram relevantes em ambos os grupos. Porém, no grupo R, houve correlação positiva de 63% enquanto que no grupo C foi identificada correlação negativa de 82%. Isto indica a redução dos valores de glicose quanto maior a insulinemia. Por outro lado, a correlação positiva no grupo R indica que, quanto maior a glicemia, maiores os níveis de insulina, provando que os animais considerados positivos têm de fato uma maior resistência à insulina nos tecidos periféricos, desta forma necessitando de maiores concentrações de insulina para manter sua função biológica, como descrito por Dunbar et al. (2016).

Os grupos considerados resistente e não resistente pelo TCGI foram comparados ainda quanto ao escore corporal, idade e tempo de estabulação.

Diversos autores relatam a correlação positiva entre o escore corporal e a RI. Em muitos casos, o acúmulo de gordura é consequência direta da resistência à insulina, pois o depósito de gordura no tecido adiposo e fígado é aumentado quando há hiperglicemia (SOUZA et al., 2007; FRANK, 2010; BLUHER, 2016; BRANFORD et al., 2016). No presente estudo, os cavalos foram classificados segundo critérios estabelecidos por Henneke (1983) e não houve diferença estatística quanto ao escore corporal dos animais, considerados resistentes ou não resistentes pelo método TCGI. Isto provavelmente ocorreu em decorrência da seleção dos animais e não em função do escore corporal não enterferir na ocorrência da resistência à insulina. Os animais selecionados foram previamente padronizados em escore de 6 a 8, com média de 7,23. Portanto, a homogeneidade dos animais avaliados provavelmente se refletiu nos grupos.

Quanto ao tempo de estabulação houve diferença estatística ($p= 0,0005$) entre os grupos definidos pelo TCGI. Este achado pode estar relacionado à menor expressão da proteína GLUT-4, proposto por alguns estudos (WILCOX, 2005; DUEHLMEIER, 2010; WALLER, 2011; FATANI, 2012) como o principal mecanismo relacionado a RI em humanos e equinos. A insulina promove a translocação da proteína GLUT-4, principal responsável pela captação da glicose.

Jose-Cunilleras (2005) identificou que a atividade física glicogênio-dependente afeta diretamente a expressão de GLUT-4, sendo assim, podemos inferir que o grupo R tem expressão gênica desta proteína reduzida e o tempo de estabulação e sedentarismo contribuíram para o estabelecimento da RI.

A diferença de idade dos cavalos considerados resistentes e não resistentes à insulina pelo TCGI também foi estatisticamente significativa ($p=0,04$). Frank (2009) relata que a resistência à insulina não relacionada a disfunção da *pars* intermedia da hipófise é mais frequente em animais entre 10 e 20 anos. Apesar desta via ainda não ter sido testada em equídeos, Ide e colaboradores (2015) apontam que em ratos mais velhos há uma menor expressão de RNA mensageiro responsável pela transcrição de IRS1 e IRS2, substratos fosforilados pelas proteínas GLUT, além da proteína InsR, causando respectivamente defeitos na sinalização intracelular e falha no metabolismo celular de glicose, e ambos os mecanismos podem colaborar com o estabelecimento da RI.

As análises não apontaram diferença estatística nos níveis séricos de frutossamina entre os grupos R e C estabelecidos por nenhum dos testes (TCGI, RRGi e RGIM). Podemos inferir que os níveis glicêmicos atingidos pelos cavalos resistentes não foi suficiente para que os níveis de frutossamina se elevassem. Portanto a resistência à insulina nestes animais não está associada a uma hiperglicemia significativa.

Kovalik e colaboradores (2012) utilizaram diferentes protocolos de corticoides para o tratamento de dermatites em cães. O uso contínuo dos corticoides aumentou os níveis de insulina, o que está relacionado a resistência à insulina. Porém, o grau de resistência à insulina induzido nesses cães não foi suficiente para o aumento da frutossamina sérica.

Os níveis glicêmicos são o principal estímulo para a liberação da insulina. Tendo em vista que a hiperglicemia não foi marcante nos equinos resistentes à insulina participantes neste estudo, podemos propor que o aumento dos níveis de insulina não está relacionado a valores supra fisiológicos de glicose.

Até a presente ocasião, os testes diagnósticos mais sensíveis e específicos são baseados em desafios glicêmicos e curva glicêmica. No entanto as alterações fisiológicas resultantes da RI em equinos estão associadas ao aumento dos níveis de insulina. Ainda não há dados em literatura que indiquem valores objetivos de

insulina séricos necessários (pico, platô ou período) para que ocorram as alterações fisiológicas relatadas anteriormente.

Os testes diagnósticos usados neste experimento apresentaram baixa concordância e nenhum cavalo foi considerado resistente a insulina pelos três métodos. Somente alguns casos sem resistência a insulina apresentaram concordância de resultados entre os três testes utilizados.

Apesar de serem amplamente utilizados em cavalos, os proxies foram desenvolvidos com base na resposta de pôneis ao MMA, porém há uma variação insulinêmica da ordem de 17% menor em pôneis quando comparados a equinos (PRATT, 2009), diferença esta que precisa ser considerada quando da avaliação dos resultados. Além disso, a análise dos grupos formados a partir dos índices RGMI e RRQI não foram significativas para nenhuma variável.

8 CONCLUSÃO

A ocorrência de resistência á insulina em cavalos estabulados, sedentários com escore de condição corporal acima do ideal e nas condições deste teste foi de 41,17%.

O TCGI necessita ajustes para sua utilização, de modo que não cause uma hipoglicemia tão marcante como a encontrada neste trabalho.

Os *proxies* RRQI e RGIM necessitam ajustes para serem utilizados em equinos.

A frutossamina não pode ser utilizada como marcador precoce para resistência à insulina em equinos.

REFERÊNCIAS

- ANNANDALE, E. J.; VALBERG, S. J.; MICKELSON, J. R.; SEAQUIST, E. R. Insulin sensitivity and skeletal muscle glucose transport in horses with equine polysaccharide storage myopathy. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, n. 10, p. 666–674, 2004.
- ANTU, K. A.; RIYA, M. P.; NAIR, A.; MISHRA, A.; SRIVASTAVA, A. K.; RAGHU, K. G. *Symplocos cochinchinensis* enhances insulin sensitivity via the down regulation of lipogenesis and insulin resistance in high energy diet rat model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.193, p.500-509, 2016.
- BAMFORD, N. J.; POTTER, S. J.; BASKERVILLE, C. L.; HARRIS, P. A.; BAILEY S. R., Effect of increased adiposity on insulin sensitivity and adipokine concentrations in different equine breeds adapted to cereal-rich or fat-rich meals. **The Veterinary Journal**. n. 214 p.14–20, 2016.
- BLUHER, M., Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? **Clinical Science** v.130, p.1603–1614, 2016.
- BORER, K. E.; BAILEY, S. R.; MENZIES-GOW, P. A.; ELLIOTT. J., Use of proxy measurements of insulin sensitivity and insulin secretory response to distinguish between normal and previously laminitic ponies. **Equine Veterinary Journal**. v. 44, n.4, p. 444-448, 2012.
- BROJER, J.; LINDASE, S.; HEDENSKOG, J.; ALVARSSON, K.; Nostell, K., Repeatability of the Combined Glucose-Insulin Tolerance Test and the Effect of a Stressor before Testing in Horses of 2 Breeds **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 27, p.1543–1550, 2013.
- CARSLAKE, H.; KARIKOSKI, N.; PINCHBECK, G.; MCGOWAN, C. Serum insulin concentration in horses: Effect of storage and handling. **Veterinary Journal**, v. 211, p. 94–96, 2008.
- CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. v. 45, p. 219–227, 2001.
- COELHO, S. A. C.; GAMA, J. A. N.; LOPES, P. F. R.; GLYCEMIA, S. V. R. C. Glicemia e concentrações séricas de insulina , triglicérides e cortisol em equinos da raça Mangalarga Marchador. **Veterinária em Foco**. v. 31, n. 9, p. 756–760, 2011.
- CHRISTOFFERSEN, B.; RIBEL, U.; RAUN, K.; GOLOZOUBOVA, V.; PACINI, G., Evaluation of different methods for assessment of insulin sensitivity in Göttingen minipigs: introduction of a new, simpler method., **American Journal of Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 297 p.1195-1201, 2009.
- DE LAAT, M. A.; KYAW-TANNER, M. T.; SILLENCE, M. N.; MCGOWAN, C. M.; POLLITT, C. C. Advanced glycation endproducts in horses with insulin-induced laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1–2, p. 395–401, 2012.

DUNBAR, L. K.; MIELNICKI, K. A.; DEMBEK, K. A.; TORIBIO, R. E.; BURNS, T. A. Evaluation of Four Diagnostic Tests for Insulin Dysregulation in Adult Light-Breed Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 885–891, 2016.

DUEHLMEIER, R.; HACKER, A.; WIDDEL-BIGDELY, A.; ENGELHARDT, W. von; SALLMANN, H. P. Insulin stimulates GLUT4 translocation in the semitendinosus muscle of Shetland ponies. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 2, p. 176–181, 2010.

EILER, H., Frank, N., Andrews, F.M., Oliver, J.W., Fecteau, K.A. Physiologic assessment of blood glucose homeostasis via combined intravenous glucose and insulin testing in 367 horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, n.9 p. 1598-1604, 2005.

FATANI, S.; ABUBAKARI, A. R.; ITUA, I.; WONG, C.; THOMAS, C.; NADERALI, E. Effects of diet-induced obesity on protein expression in insulin signaling pathways of skeletal muscle in male Wistar rats. **International Journal of General Medicine**. v. 5, p. 573–582, 2012.

FIRSHMAN, A. M.; VALBERG, S. J. Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in horses. **Equine veterinary journal**, v. 39, n. 6, p. 567–575, 2007.

FRANK, N. Insulin resistance in horses. **AAEP Proceedings**, v. 52, p. 51–54, 2006.

FRANK N. Endocrinopathic laminitis, obesity-associated laminitis, and pasture-associated laminitis. **Proceedings of 54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**. San Diego, CA; 2008.

FRANK, N. Equine Metabolic Syndrome. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 27, n.1, p.73–92, 2011.

FRANK, N.; ELLIOTT, S. B.; BRANDT, L. E.; KEISLER, D. H. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. **Journal of American Veterinary Association** v.9, p.1383-1390, 2005

FRANK, N., GEOR, R. J.; BAILEY, S. R.; DURHAM, A. E.; HOHNSON, P. J. Equine Metabolic Syndrome, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, n.3, p. 467 - 475, 2010

FUNK R. A.; WOOLDRIDGE A. A.; STEWART A. J.; BEHREND E. N.; KEMPPAINEN R. J.; ZHONG Q.; JOHNSON A. K., Seasonal Changes in the Combined Glucose-Insulin Tolerance Test in Normal Aged Horses, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p. 1035–1041, 2012.

HENNEKE, D. R.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L.; YEATS, B. F. Relationship between body condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 15, n. 4, p. 371-372, Nov. 1983.

HUANG, C.-W.; CHIEN, Y.-S.; CHEN, Y.-J.; AJUWON, K.; MERSMANN, H.; DING, S.-T. Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Ameliorating the Obesity-Induced Metabolic Syndrome in Animal Models and Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1689, 2016.

JOHNSON, P. J., S. H. Slight, V. K. Ganjam, and J. M. Kreeger., Glucocorticoids and laminitis in the horse. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice** v.18, p. 219–236, 2002.

JOHNSON, P.J.; WIEDMEYER, C.E; LACARRUBBA, A.; MESSER, N.T.; DINGFELDER H.A.; COGSWELL A. M.; AMORIM J. R. R.; GANJAM, V. K., Clinical Assessment of Blood Glucose Homeostasis in Horses: Comparison of a Continuous Glucose Monitoring System with a Combined Intravenous Glucose and Insulin Test Protocol, Brief Communication. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 25, p. 162-165. 2011.

JOSE-CUNILLERAS, E., HAYES, K. A., TORIBIO, R. E.; MATHES, L.E.; HINCHCLIFF, K. W. Expression of equine glucose transporter type 4 in skeletal muscle after glycogen-depending exercise. **American Journal of Veterinary Research**. v. 66, n. 3 p. 379-385, 2005.

KALARIA, T. R.; SIRAJWALA, H. B.; GOHEL, M. G. Serum fructosamine , serum glycated albumin and serum glycated β -lipoprotein in type 2 diabetes mellitus patients with and without microvascular complications. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v.15, p.53, 2016.

KARIKOSKI, N.P.; HORN, I.; MCGOWAN, T. W.; MCGOWAN, C. M., The prevalence of endocrinopathic laminitis among horses presented for laminitis at a first-opinion/referral equine hospital. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 41, p.111–117. 2011

KOVALIK, M.; THODAY, K. L.; EVANS, H.; ADRI, H. M. B.; MELLANBY, R. J., Prednisolone is associated with an increase in serum insulin but not serum fructosamine concentrations in dogs with atopic dermatitis. **The Veterinary Journal**. v. 192, p.212-216, 2012.

KRONFELD, D. S. et al. Insulin resistance in the horse: Definition, detection, and dietetics. **Journal Animal Science** , v.83, suppl. E22–E31, 2005b.

KRONFELD, D. S.; TREIBER, K. H.; GEOR, R. J. Comparison of nonspecific indications and quantitative methods for the assessment of insulin resistance in horses and ponies. Veterinary Medical Today: Timely Topics in Nutrition. In: **Journal American Veterinary Medical Association** , v.226, n.5, p.712-719, 2005a.

LACOMBE, V. a. Expression and regulation of facilitative glucose transporters in equine insulin-sensitive tissue: from physiology to pathology. **International Scholarly Research Notice Veterinary Science**, v. 2014, id. 409547, 2014.

LEE, J.-E. Alternative biomarkers for assessing glycemic control in diabetes: fructosamine, glycated albumin, and 1,5-anhydroglucitol. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 20, n. 2, p. 74–8, 2015.

MENDOZA, F. J.; CARA, C. A. G.; TORIBIO, R. E.; ESTEPA, J. C. Department of Animal Medicine and Surgery, University of Cordoba, Campus Rabanales. **The Veterinary Journal**, v.3, p.371-373, 2015.

McGOWAN, T. W., GEOR, R., EVANS, H., SILENCE, M., MUNN, K., McGOWAN, C. M., Comparison of 4 assays for serum insulin analysis in the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine** v.22, p.734 –735, 2008.

PRATT, S. E.; SILICIANO, P. D.; WALSTON, L. Variation of Insulin Sensitivity Estimates in Horses. **Journal of equine Veterinary Science**. v. 29, n. 6, p. 507-512, 2009.

PRATT, S. E.; GEOR, R. J.; MCCUTCHEON, L. J.; Repeatability of two methods for assessment of insulin sensitivity and glucose dynamics in horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.19; p.883–888, 2014.

SAH, S. P.; SINGH, B.; CHOUDHARY, S.; KUMAR, A. Animal models of insulin resistance: A review. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1165–1177, 2016.

SCHUVER, A.; FRANK, N.; CHAMEROY, K. A.; ELLIOTT, S. B. Assessment of insulin and glucose dynamics by using an oral sugar test in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 4, p. 465–470, 2014.

SECHI, L. A., BARTOLI, E., Molecular mechanisms of insulin resistance in arterial hypertension. **Blood Pressure. Supplement Journal**. v.17 p. 47-54, 1996.

SOUZA, F. A.; VALE FILHO, V. R.; LIMA, A.L.; CANISSO, I. F.; SILVA, E. C. Síndrome metabólica equina: resistência à insulina. **Veterinária em Foco**, v.5, n.1, p.71-78, 2007.

SUAGEE, J. K.; CORL, B. A.; HULVER, M. W.; MCCUTCHEON, L. J.; GEOR, R. J. Effects of hyperinsulinemia on glucose and lipid transporter expression in insulin-sensitive horses. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 40, n. 3, p. 173–181, 2011.

TORIBIO, R. in REED, S.M., BAYLY, W.M. **Equine internal medicine**. 3 ed. St. Louis: Saunders, 2010. 1466p.

THOMAS, D. M.; UDAGAWA, N.; HARDS, D. K.; Insulin receptor expression in primary and cultured osteoclastlike cells. **Bone**. v. 23, p.181- 186, 1998.

TREIBER, K. H.; KRONFELD, D. S.; HESS, T. M.; BOSTON, R. C.; HARIS, P. A., Use of proxies and reference quintiles obtained from minimal model analysis for determination of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell responsiveness in horses. **American Journal of Veterinary Research**. v. 66, p. 2114, 2005.

WALLER, A. P.; BURNS, T. A.; MUDGE, M. C.; BELKNAP, J. K.; LACOMBE, V. A. Insulin Resistance Selectively Alters Cell-Surface Glucose Transporters but not their Total Protein Expression in Equine Skeletal Muscle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.25, p. 315–321, 2011.

WALLER, A. P.; HUETTNER, L.; KOHLER, K.; LACOMBE, V. A. Novel link between inflammation and impaired glucose transport during equine insulin resistance. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 149, n. 3–4, p. 208–215, 2012.

WHEATCROFT, S. B.; WILLIAMS, I. L.; SHAH, A. M.; KEARNEY, M. T., Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. **Diabetic Medicine**. v. 20, p. 255- 268, 2003.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **The Clinical Biochemistry Reviews**. v.26, p. 19–39, 2005.

ZHANG, L.; KEUNG, W.; SAMOKHVALOV, V.; WANG, W.; LOPASCHUK, G. D.; Role of fatty acid uptake and fatty acid [beta]-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. **Biochimica and Biophysica Acta**. v.18, p.1801-1807, 2016.