RAFAEL FRANÇOSO

**Utilização do aparelho FreeStyle Libre para monitoração contínua
da glicemia em equinos**

São Paulo

2018

RAFAEL FRANÇOSO

**Utilização do aparelho FreeStyle Libre para monitoração contínua
da glicemia em equinos**

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2018

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3637
FMVZ

Françoso, Rafael
Utilização do aparelho FreeStyle Libre para monitoração contínua da glicemia em equinos / Rafael Françaço. – 2018.
73 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Resistência Insulínica. 2. Glicemia Intersticial. 3. Obesidade em equinos 4. Monitoração contínua. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Utilização do Aparelho Freestyle Libre para Monitoração Contínua da Glicemia em Equinos", protocolada sob o CEUA nº 2969130917, sob a responsabilidade de **Carla Bargi Belli e equipe; Rafael Françoso** - 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 22/11/2017.

We certify that the proposal "Use of the Freestyle Libre for Continuous Monitoring of Glycemia in Horses", utilizing 15 Equines (males and females), protocol number CEUA 2969130917, under the responsibility of **Carla Bargi Belli and team; Rafael Françoso** - 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 11/22/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2017** a **10/2018**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 20 anos**

N: **15**

Linhagem: **sem especificação**

Peso: **300 a 600 kg**

Resumo: Os sistemas de monitoração contínua da glicose foram desenvolvidos para monitorar as concentrações intersticiais de glicose, eliminando a necessidade de repetidas coletas de sangue. Esses sistemas possuem um sensor que é aplicado na superfície do corpo para medir a glicose e um transmissor através do qual são exibidos os níveis de glicose. A mais nova geração desses aparelhos mensura imediatamente os valores, permitindo a intervenção em tempo real. Um novo sistema recentemente foi licenciado para utilização no mercado da União Europeia, denominado de monitorização contínua instantânea da glicose. As mensurações de glicose intersticial são mensuradas a cada minuto através de sensor descartável, inserido sob a pele podendo ser usado por até 14 dias, é calibrado de fábrica e não requer amostra de sangue para calibragem. A mensuração contínua da glicose pode ser útil em várias situações clínicas na veterinária de equinos. No entanto, esse sensor ainda não está padronizado para o uso nessa espécie. Assim, é proposta essa padronização com a utilização de 15 equinos.

Local do experimento: Local de origem do animal ou HOVET-USP quando o animal for encaminhado ao mesmo

São Paulo, 15 de março de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FRANÇOSO, Rafael

Título: **Utilização do aparelho FreeStyle Libre para monitoração contínua da glicemia em equinos**

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu avô pelos ensinamentos diários de vida, que me faz sempre procurar ser uma pessoa melhor;

Ao meu pai, Pedro Genésio Françoso, que sempre acreditou nos meus planos de estudo;

Ao meu irmão, Jonas Françoso, mesmo distante está presente todos os dias em minha vida, sempre me apoiando e ajudando em todos os sentidos, sem ele seria impossível concluir esse objetivo;

Aos meus parentes da família Françoso pelo apoio e incentivo em todos os momentos, especialmente aos meus tios e tias, Aparecido Carlos Françoso, Elaine Ribeiro, Roberto Carlos Françoso e Valquíria Prado Françoso;

A família Belentani pela paciência, convivência, amor, carinho e cuidados proporcionados;

Aos animais utilizados, que permitiram o desenvolvimento de novos conhecimentos e discussões científicas no âmbito da Medicina Veterinária.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores do Departamento de Clínica Médica de Equinos (VCM): Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Wilson Roberto Fernandes, Maria Cláudia Sucupira e Marcio Brunetto.

A minha namorada Diéli Belentani pelo companheirismo, paciência, incentivo e apoio. A minha "orientadora" professora Dra. Carla Bargi Belli pela paciência, dedicação, e oportunidade para que eu realizasse esse sonho.

Aos colegas de pós graduação, em especial ao Guilherme de La Penha Chiacchio Fernandes, Fabio Alves Teixeira, Filipe Klug e Leticia Castro, pelo apoio, troca de ideias e informações técnicas.

Aos Proprietários dos animais que participaram desse experimento.

“A nossa felicidade depende mais do que temos nas nossas cabeças, do que nos nossos bolsos.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

FRANÇOSO, R. **Utilização do aparelho FreeStyle Libre para monitoração contínua da glicemia em equinos. [Use of the FreeStyle Libre for continuous monitoring of glycemia in horses]**. 2018. 73f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os sistemas de monitoração contínua da glicose (SMCG) foram desenvolvidos para monitorar as concentrações intersticiais de glicose em pacientes diabéticos, eliminando a necessidade de repetidas coletas de sangue. Vários estudos em humanos e animais indicam que a glicose intersticial possui correlação com a glicose sanguínea, mas poucos estudos abordam o uso clínico em equinos e há poucos aparelhos padronizados na espécie. O presente estudo teve como objetivo padronizar um novo SMCG intersticial (FreeStyle Libre) em cavalos hígdos e obesos, avaliar a fixação do sensor na pele do cavalo, e avaliar a eficácia do dispositivo no auxílio ao diagnóstico de resistência à insulina durante o teste combinado de glicose e insulina. Para isso foram usados 10 equinos adultos. O sensor foi fixado na região dorsolateral do terço inicial do pescoço de todos os animais. A dosagem de glicemia laboratorial e pelo aparelho foram comparadas em vários tempos. Em cinco cavalos (com escore corporal de 5 a 6) foram apenas realizadas essas dosagens e o acompanhamento por 7 dias da fixação do sensor. Nos outros cinco animais (com escore corporal acima de 7), foi realizado também o teste combinado de glicose e insulina. O aparelho permaneceu fixado entre 3 e 7 dias em 6 dos 10 animais. Houve ótima concordância entre os valores de glicose nos dois sistemas, ocorrendo apenas um pequeno atraso na detecção de variações bruscas de glicemia pelo aparelho testado. Assim concluiu-se que o sistema de monitoramento contínuo da glicose FreeStyle Libre pode ser utilizado para avaliação indireta da glicemia por meio da glicose intersticial em cavalos adultos hígdos e obesos, inclusive durante o teste combinado de glicose e insulina.

Palavras-chave: Resistência insulínica. Glicemia intersticial. Obesidade em equinos, Monitoração contínua.

ABSTRACT

FRANÇOSO, R. **Use of the FreeStyle Libre for continuous monitoring of glycemia in horses. [Utilização do aparelho FreeStyle Libre para monitoração contínua da glicemia em equinos]**. 2018. 73f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Continuous glucose monitoring systems (CGMS) have been developed to monitor interstitial glucose concentrations in diabetic patients, eliminating the need for repeated blood sampling. Several studies in humans and animals indicate that interstitial glucose correlates with blood glucose, but few studies address clinical use in horses and there are few standardized devices in the species. The present study aimed to standardize a new interstitial CGMS (FreeStyle Libre) on healthy and obese horses, to evaluate the fixation of the sensor on horse skin, and to evaluate the efficacy of the device in aiding the diagnosis of insulin resistance during the combined test of glucose and insulin. For this, 10 adult horses were used. The sensor was attached to the dorsolateral region of the initial third of the neck of all animals. Dosage of laboratory blood glucose and by the device were compared at various times. In five horses (with a body score of 5 to 6), these measurements were only performed and the 7-day follow-up of the sensor fixation was performed. In the other five animals (with body score above 7), the combined glucose and insulin test was also performed. The device remained fixed for 3 to 7 days in 6 of the 10 animals. There was excellent agreement between the glucose values in both systems, with only a slight delay in the detection of abrupt changes in glycemia by the tested device. Thus, it can be concluded that the FreeStyle Libre glucose monitoring system can be used for indirect evaluation of glycemia through interstitial glucose in healthy and obese adult horses, including during the combined glucose and insulin test.

Keywords: Insulin resistance. Interstitial glycemia. Obesity in horses. Continuous monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos compartimentos, sendo: (C ₁ compartimento capilar), (C ₂ compartimento subcutâneo).....	19
Figura 2a, 2b, 2c - Representação das reações enzimáticas no sensor do leitor.....	22
Figura 3 - Ponto de aplicação e fixação do sensor para monitoração da glicose intersticial.....	45
Figura 4 - Sensor com o cateter do aparelho Freestyle Libre e aplicador com sensor.....	47
Figura 5 - Rastreamento do sensor e gráfico de leitura diária de glicemia.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) dos valores de ECC, peso e idade dos grupos hígidos e obesos.....	50
Tabela 2 - Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) de glicose (mg/dL), (SCMG e Enzimático) dos grupos hígidos e obesos ao longo do tempo.....	52
Tabela 3 - Resultado da análise grade de erros dos grupos Hígidos e Obesos.....	52
Tabela 4 - Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) de glicose (mg/dL), (FreeStyle Libre e enzimático) do teste combinado glicose insulina no grupo obesos.....	56
Tabela 5 - Resultado da análise grade de erros no grupo obeso submetido ao teste combinado e glicose e insulina.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as glicemias (mg/dL) do grupo Hígidos, analisadas com as técnicas de Freestyle Libre e laboratorial	51
Gráfico 2 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as glicemias (mg/dL) do grupo Obesos, analisadas com as técnicas de Freestyle Libre e laboratorial.....	51
Gráfico 3 - Avaliação pela análise da grade de erros do glicosímetro FreeStyle Libre em animais hígido e obesos, evidenciando 88,89% das leituras na zona A (precisão analítica) e 9,72% delas na zona b, onde 98,61% dos valores se encontram nas zonas A e B.....	53
Gráfico 4 - Gráfico de dispersão para a diferença e média entre os valores de glicemia nos grupos obesos e hígidos obtidos pelos métodos (FreeStyle Libre) e enzimático (laboratorial) (as linhas verde e vermelha representam os limites superiores e inferior de concordância; a linha pontilhada representa o valor médio do viés)	54
Gráfico 5 - Dosagem de glicemia em animal resistente á insulina ao longo do tempo, utilizando os métodos FreeStyle Libre e enzimático.....	55
Gráfico 6 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as glicemias (mg/dL) do grupo Obesos, analisadas com as técnicas de Freestyle Libre e laboratorial.....	55
Gráfico 7 - Avaliação pela análise da grade de erros do glicosímetro FreeStyle Libre em animais obesos submetidos ao teste combinado de glicose e insulina.....	57
Gráfico 8 - Gráfico de dispersão para a diferença e média entre os valores de glicemia no grupo obeso submetido ao teste combinado de tolerância de glicose e insulina, métodos (FreeStyle Libre) e enzimático (laboratorial) (as linhas verde e vermelha representam o limite superior e inferior de concordância; a linha pontilhada representa o valor médio do viés)	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 HISTÓRIA DA GLICEMIA	16
2.2 GLICOSE DO FLUIDO INTERSTICIAL	18
2.3 SISTEMA CONTÍNUO DE MONITORAÇÃO DA GLICOSE (SMCG)	19
2.3.1 Dispositivos para o sistema contínuo de monitoramento da glicemia	21
2.3.1.1 Dispositivo Medtronic	21
2.3.1.2 Dispositivo Dexcom STS	23
2.3.1.3 Dispositivo Freestyle Navigator	23
2.3.1.4 Dispositivo Dexcom G4 Platinum	24
2.3.1.5 Dispositivo FreeStyle Libre Pro Flash	24
2.3.1.6 Dispositivo MiniMed iPRO2	25
2.4 LIMITAÇÕES ATUAIS	25
2.5 FUTURO: SISTEMA DE CIRCUITO FECHADO	27
2.6 SINDROME METABÓLICA EQUINA	27
2.7. DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA À INSULINA	29
2.7.1 CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO SANGUE EM JEJUM	30
2.7.2 CLAMP HIPERINSULINÊMICO E EUGLICÊMICO	30
2.7.3 TESTE DE SENSIBILIDADE À INSULINA	31
2.7.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAVENOSA	32
2.7.5 TESTE COMBINADO DE GLICOSE E INSULINA	32
2.7.6 TESTES DE SUBSTITUIÇÃO	33
2.8. DIAGNÓSTICO DE HIPERINSULINEMIA	34
2.8.1 CONCENTRAÇÃO BASAL DE INSULINA	34
2.8.2 TESTE DE AÇÚCAR ORAL	34
2.8.3 TESTE ORAL DE GLICOSE	35
2.9. DIAGNÓSTICO DE DESREGULAÇÃO DE INSULINA	35
2.9.1 COMBINAÇÃO DE TESTES	35
2.9.2 FATORES DE INTERFERÊNCIA	38
2.10 UTILIZAÇÃO dos testes em equinos	39
3. OBJETIVOS	41

4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 ANIMAIS	42
4.2 AVALIAÇÃO DE CONDIÇÃO DE ESCORE CORPORAL.....	43
4.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS E PROCESSAMENTO.....	44
4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	46
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5. RESULTADOS	50
5.1 AVALIAÇÃO GLICÊMICA ENTRE HÍGIDOS E OBESOS.....	50
5.2 TESTE COMBINADO DE GLICOSE E INSULINA.....	54
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Severas doenças no cavalo são relacionadas com resistência à insulina: síndrome metabólica equina (JOHNSON, 2002), laminite (TREIBER et al., 2006), adenoma pituitário (GARCIA; BEECH, 1986), hiperlipidemia (JEFFCOTT; FIELD, 1985) e osteocondrose (RALSTON, 1996). Os cavalos acometidos muitas vezes são alimentados com baixo teor de amido ou recebem dietas de baixo índice glicêmico. Concentrados com baixo teor de amido estão sendo comercializados como auxílio na gestão de doenças, mas também estão sendo destinados como alternativas mais seguras de alimentação dos equinos (JOHNSON, 2002; KRONFELD et al., 2005)

Para desenvolver e avaliar dietas com baixo teor de amido é necessário protocolos de monitoração continua da glicemia e, portanto, requer pesquisa contínua de mensuração das concentrações de glicose no sangue por um longo período de tempo. A utilização de equipamentos de laboratório para medir a glicose, pode ser inviável e dispendioso (SLOUGH et al, 2011).

A utilização de dispositivos para monitoramento de glicose na propriedade onde se encontra o animal é conveniente, relativamente barato, e prontamente disponível.

Além disso, em várias situações clínicas, principalmente durante a internação, e para a realização de curvas glicêmicas, é necessário que várias amostras de sangue sejam colhidas, gerando estresse ao animal, além de ser um procedimento invasivo. O monitoramento contínuo de glicose seria uma alternativa mas alguns equipamentos utilizados em humanos ainda não foram padronizados para uso em equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRIA DA GLICEMIA

Aproximadamente em 1552 a.C. foi relatado pelo médico egípcio Hesy-Ra a existência de diabetes e seus sintomas foram descritos. Ele relatou os sintomas que seus pacientes apresentaram, como micção frequente. O primeiro caminho para estudar diabetes mellitus foi através do exame da urina, principalmente indicando se havia algum tipo de açúcar presente na mesma. Naquela época um diagnóstico de diabetes através da análise da urina costumava significar que a morte estava se aproximando rapidamente, pois a única intervenção conhecida na época era mudando a dieta, que muitas vezes era tarde demais para alterar o desenvolvimento da doença (SWIDORSKI, 2014).

No início do século 20, o médico Dr. Frederick Allen aconselhou pacientes a manterem uma dieta hipocalórica, proporcionando a pacientes com diabetes ampliar suas vidas por cerca de um ano ou mais (ROBERT et al., 2014). Em 1921, o jovem Cirurgião canadense Dr. Frederick Banting, manteve a sobrevivência de um cão diabético injetando nele extratos de pâncreas caninos. James Collip ainda purificou o extrato para uso final em seres humanos. Em 1923, Eli Lilly iniciou a produção comercial do que é conhecido hoje como "insulina" (SWIDORSKI, 2014).

Com este avanço médico o extrato de pâncreas começou a se disseminar, porém ainda havia necessidade de medir o valor de glicemia no paciente antes da aplicação de insulina. Sem uma medição precisa do nível de açúcar do paciente, a injeção de insulina podia representar mais um risco para o paciente, em vez de um benefício, induzindo hipoglicemia. Em 1925, os testes caseiros para diagnóstico de glicosúria foram desenvolvidos, o teste necessitava de oito gotas de urina do paciente para ser misturada em um tubo de ensaio com 6 ml de solução de Benedict. Após ebulição em água por vários minutos, a mudança de cor observada determinava o nível de açúcar, onde a cor verde representava glicosúria leve, amarelo representava glicosúria moderada e vermelho/laranja indicava glicosúria acentuada (SWIDORSKI, 2014).

Em 1946, Alfred Free e o Laboratório Miles criaram um departamento de bioquímica, uma empresa mais conhecida por "Alka-Seltzer". Alfred Free reconhecia que o método era inespecífico pois não mensurava todos os tipos de açúcar, portanto, esta limitação do teste causava hesitação no uso pelos médicos. No final de 1940, Helen Free desenvolveu o teste de urina conhecido como Clinistix, que foi capaz de monitorar os níveis de glicose na urina de forma praticamente instantânea. Esse teste usava uma tira de papel incorporada com os reagentes, compreendendo o primeiro teste específico para glicose, com lançamento em 1956. Este avanço utilizou uma dupla reação enzimática sequencial via glicose oxidase, peroxidase e orto-toluidina. Nesta reação, a glicose oxidase catalisa a oxidação de glicose para o ácido glucônico enquanto também converte oxigênio em peróxido de hidrogênio. Com uma peroxidase, o peróxido de hidrogênio foi usado para a oxidação da orto-toluidina em cromogênio azul que foi o indicador visual do nível de glicose (CLARKE, 2012).

Alterações foram feitas nesse extenso processo e em 1964 outro teste chegou ao mercado com o nome de Combur-Test, fabricado pela empresa Boehringer Mannheim. Este teste foi sensível à glicose, proteína, pH da urina, e até mesmo estendido para incluir cetonas, sendo o produto conhecido posteriormente como Ketostix / Ketodiastix. Embora os testes de urina no mercado fossem indolores e de baixo custo, alguns apresentavam limitações, tais como o inconveniente devido a exigência de urina, e aparência de um teste "sujo" e / ou com pouca higiene (CLARKE, 2012). Além disso, existia a dificuldade de avaliar as mensurações de glicose no sangue e obter conclusões, devido a diferença de açúcares que estavam sendo excretados quando comparados com os níveis presente no sangue, outra dificuldade era detectar hipoglicemia, a insuficiência renal e outras substâncias encontradas na urina que poderiam alterar as leituras no momento (SWIDORSKI, 2014).

Com todas essas limitações em mente, os pesquisadores continuaram a buscar alternativas para monitorar a glicose e, ao mesmo tempo, medicamentos orais para ajudar a reduzir a glicemia começaram ser introduzidos no mercado. À medida que os pacientes se tornaram conscientes dos benefícios de medir os níveis de glicose, aumentou a demanda de dispositivos para testes rápidos e práticos. O primeiro teste de tiras para glicemia foi desenvolvido em 1964 pela empresa Earnest C Adams e foi registrado como Dextrostix dos laboratórios de Ames-Miles, sendo o primeiro teste de açúcar no sangue de reagente seco. Foi utilizada a reação de oxidase/ peroxidase, mas foi adicionado uma membrana semipermeável externa para bloquear glóbulos

vermelhos, permitindo que a glicose passasse pela membrana para reagir com a os reagentes secos acima mencionados (SWIDORSKI, 2014).

A abordagem passo a passo para este teste, desenvolvido por Anton Clemens da Ames-Miles, exigia uma gota de sangue para ser colocado na tira de papel por 1 min, e depois para ser lavada. A cor que permanecia era comparada a um gráfico de cores padrão, fornecendo uma estimativa aproximada dos níveis de glicose no sangue de um paciente. Mas havia limitações. O teste exigia uma grande gota de sangue (30uL), um tempo de reação de 60 segundos, e dependia da correspondência de cores (SWIDORSKI, 2014).

O teste Dextrostix estabeleceu as bases para a futura área de pesquisa hoje conhecido como medidores de glicose no sangue. Novas tecnologias começaram a alcançar o mercado, como os sistemas de biosensor de glicose no sangue. Os sistemas de monitoramento de glicose no sangue se concentram na facilidade de uso para o paciente em aspectos como volume de sangue, número de medidas que poderiam ser salvos. O aspecto mais importante do dispositivo é que ele seja compatível com a American Diabetes Association (ADA) que mudou a sua variação alvo para 5% entre medidores e métodos laboratoriais (SWIDORSKI, 2014).

2.2 GLICOSE DO FLUIDO INTERSTICIAL

Os sensores de monitoramento contínuo de glicose (SMCG) medem a concentração de glicose no fluido intersticial (GFI), mas vários estudos demonstraram que o equilíbrio de glicose através da barreira endotelial capilar não é instantâneo (FACCHINETTI et al., 2007). Como consequência, a GFI e as concentrações de glicose plasmática exibem padrões dinâmicos diferentes, particularmente durante mudanças rápidas (Steil et al., 2003). A obtenção de um panorama da concentração plasmática de glicose é mais precisa do que leituras de GFI, portanto, o tempo fisiológico das medições do sensor SMCG poderiam ser compensados. O modelo de dois compartimentos (Figura 1) foi proposto na literatura com base em estudos de clamp hipoglicêmico. Supondo que a resposta de impulso do sistema de interstício de plasma esteja disponível, o problema de estimativa de entrada pode ser resolvido através da deconvolução (KEENAN et al., 2013; FACCHINETTI et al., 2007).

Figura 1: Representação dos compartimentos, sendo: (C_1 compartimento capilar), (C_2 compartimento subcutâneo).

Fonte: Keenan et al. (2013).

2.3 SISTEMA CONTÍNUO DE MONITORAÇÃO DA GLICOSE (SMCG)

A partir de 1999, uma nova era no tratamento do diabetes começou, o sistema contínuo de monitorização da glicose (SMCG) foi aprovado para ajudar as pessoas a serem diagnosticadas com diabetes. O desenvolvimento dessa nova tecnologia permitiu que os pacientes monitorassem a glicemia inserindo um dispositivo por via subcutânea, medindo os níveis de glicose do paciente no fluido intersticial diariamente (SWIDORSKI, 2014).

O desenvolvimento do SMCG permitiu a pacientes e médicos obterem conhecimento mais aprofundado das oscilações na glicemia. O sensor é um componente do sistema contínuo de monitorização da glicose e é capaz de tomar medidas a cada minuto, permitindo aos médicos realizarem ajustes de longo prazo na terapia. Outro benefício do SMCG é a detecção de hipoglicemia e hiperglicemia (OLCZUK et al., 2017).

Os sistemas de monitoração contínua da glicose foram desenvolvidos para monitorar as concentrações intersticiais de glicose em pacientes diabéticos,

detectando rapidamente a hipoglicemia, eliminando a necessidade de repetidas coletas de sangue, e avaliando variabilidade glicêmica (EILER, 2005; RALSTON, 1996).

Diferentes sistemas de SMCG em tempo real estão disponíveis para uso em pacientes diabéticos humanos e em cães diabéticos. A avaliação da curva glicêmica permite ao clínico determinar se a insulina administrada é eficaz e identifica o tempo de pico de efeito da insulina, duração da insulina, efeito e grau de flutuação nas concentrações de glicose no sangue (PICKUP, 2011).

Os dispositivos de monitoração contínua de glicose intersticial possuem um sensor que é aplicado na superfície do corpo para medir a glicose e um transmissor, através do qual são exibidos os níveis de glicose. A mais nova geração desses aparelhos mensura imediatamente os valores, permitindo a intervenção em tempo real. No entanto, a principal deficiência da maior parte deles é que precisam ser calibrados e, portanto, é necessária uma amostragem de sangue capilar periodicamente (CORRADINI et al., 2016).

Os dispositivos mais atualizados enviam sinais de alerta aos pacientes quando a sua glicemia fica abaixo da concentração aceitável, os extremos de hipoglicemia e hiperglicemia são conhecidos por colocar um paciente com diabetes em maior risco de acidente vascular cerebral, perda de visão, doença renal amputações e até a morte, portanto, prevenir estas complicações com SMCG podem melhorar a qualidade de vida do paciente. Desde o advento do SMCG, o desafio é o tempo de atraso da leitura, bem como a precisão, mas avanços significativos foram feitos desde 1999, com maior versatilidade, novas indicações e maior precisão (OLCZUK et al., 2017).

Um novo sistema recentemente foi licenciado para utilização no mercado da União Europeia, denominado de monitorização contínua instantânea da glicose. As mensurações de glicose intersticial são mensuradas a cada minuto através de sensor descartável, medindo 3,5 centímetro, com cateter de 0,5 centímetro, inserido sob a pele, podendo ser usado por até 14 dias. Ele é calibrado de fábrica e não requer amostra de sangue para calibragem (CORRADINI et al., 2016).

2.3.1 Dispositivos para o sistema contínuo de monitoramento da glicemia

Diversos dispositivos médicos para SMCG receberam aprovação prévia ao mercado pela Food and Drug Administration (FDA) desde 1999. As três principais empresas desta indústria são Abbott Laboratories, Medtronic e Dexcom Inc. A Abbott Laboratories é uma empresa mundial de cuidados de saúde que realiza fabricação de medicamentos genéricos, dispositivos médicos, diagnósticos, e produtos nutricionais, trabalhando em uma variedade de dispositivos médicos e mantém uma divisão separada para cuidados com diabetes onde lançaram vários dispositivos de monitoramento de glicose, entre eles o Freestyle (Freedom Lite, InsulinX, Lite e Precision Neo) que são comumente prescritos por médicos e vendidos nas farmácias. Em termos de monitoramento de glicose, os dois produtos lançados foram o Freestyle Navigator em 2008 e o Freestyle Libre Pro Flash em 2016 (OLCZUK et al., 2017).

A Medtronic é uma das maiores empresas de dispositivos do mundo, e lançou a primeira tecnologia para diabetes em 1999, chamado de sistema de monitoração contínua de glicose, e também produziu bombas de insulina. Alguns dos produtos liberados foram o MiniMed 530G, 630 System e 670G System. A Dexcom é uma empresa situada nos Estados Unidos que trabalha unicamente no desenvolvimento, fabricação e distribuição de SMCG para gerenciamento de diabetes no mundo todo. A primeira tecnologia SMCG foi lançada em 2006 chamado Dexcom STS. Mais recentemente, a empresa lançou sua plataforma G5 compatível com dispositivos celulares Android, o sistema de monitoramento também recebeu aprovação da FDA para expandir sua indicação para a população pediátrica, com idades entre 2 anos e 18 anos. Junto com a Medtronic, a Dexcom fez um acordo com a Tandem Diabetes para ingressar no mercado de bombas de insulina compatíveis para o G5 e futuros sistemas (OLCZUK et al., 2017).

2.3.1.1 Dispositivo Medtronic

O Primeiro sistema contínuo de monitoramento de glicose, foi lançado pela Medtronic MiniMed em 1999, com objetivo de registro contínuo dos níveis de glicose

intersticial em um paciente com diabetes. No entanto, foi indicado pela FDA que as informações fornecidas pelo dispositivo eram apenas complementares ao dispositivo padrão de monitoramento de glicose doméstico, portanto, ele deveria ser usado ocasionalmente e não para uso diário (FAD, 2017).

Com o dispositivo considerado suplementar ao monitoramento de glicose domiciliar, as leituras do SMCG não eram informações suficientes para assegurar ação terapêutica. O MiniMed era apenas um dispositivo que fornecia leituras em um intervalo para até 72 horas, esse dispositivo foi testado clinicamente em adultos com Diabetes tipo I, deixando muitas subpopulações como a pediatria, outras etnias e diabéticos tipo II sem dados para apoiar o uso desta tecnologia. O sistema consistiu em um monitor, um sensor de glicose, cabo de conexão e software compatível com o Windows 95 que permitia armazenamento de leituras de glicose (FAD, 2017)

Um sinal de sensor de glicose era emitido a cada 10 segundos, com uma média de leitura documentada e salva a cada 5 minutos. O monitor também foi capaz de armazenar valores de glicose por até 14 dias. Ao longo dos anos, o software foi atualizado, adicionando alertas de hipoglicemia, hiperglicemia, aumento dos dados de armazenamento de 14 a 21 dias e capacidade de fornecer valores de glicose em tempo real aos usuários. Com os avanços, o nome do produto foi alterado para Guardian Connect. A principal semelhança entre a primeira geração do SMCG e as demais é a utilização da tecnologia de leitura, onde o transdutor promove resposta elétrica dentro do biosensor amperométrico, a glicose reage com a glicose oxidase (GOx) e o cofator redox dinucleótido de flavina adenina (FAD) para produzir uma lactona de glicose (Figura 2a). O FAD atua como um receptor de elétrons, tornando-se FADH₂, o cofator é regenerado pela reação com oxigênio, levando à produção de hidrogênio peróxido (Figura 2b), que migra para a superfície do metal no sensor (Figura 2c) (OLCKUK; PRIEFER, 2017).

Figura 2 - 2a, 2b e 2c: Representação das reações enzimáticas no sensor do leitor.

Fonte: OLCKUZ (2017).

2.3.1.2 Dispositivo Dexcom STS

Este aparelho de SMCG é semelhante ao Medtronic, sendo que o DexCom STS® foi aprovado em 2006 como indicação complementar a um dispositivo padrão de automonitoramento glicêmico, sendo indicado para adultos acima dos 18 anos portador de diabetes (Tipo I ou II) com receita médica. Este aparelho exigia calibração a cada 12 horas para garantir o desempenho do dispositivo, que é um período de tempo similar usado nos ensaios clínicos do Medtronic (FAD, 2017).

O dispositivo era capaz de registrar os valores e as tendências de glicose em tempo real em até 72 horas, e consistia em 3 componentes: sensor, transmissor e receptor. Após inserido subcutaneamente, o sensor permanecia 2 horas em período de inicialização, e posteriormente exigia calibração com um medidor de glicose no sangue, especificamente o OneTouch Ultra (FAD, 2017).

O modelo DexCom STS também possuía um recurso que o usuário pode programar alertas para indicar alta e baixa glicemia. Este receptor possuía duração de 5 dias, sendo removido do mercado em 2015 para lançamento do dispositivo da próxima geração da Dexcom, denominado G4 Platinum (FAD, 2017).

2.3.1.3 Dispositivo Freestyle Navigator

O terceiro dispositivo que chegou ao mercado foi o Freestyle Navigator, pela empresa Abbott Laboratories em 2008, este dispositivo recebeu indicação para a mesma população que o Dexcom STS. A diferença do Freestyle Navigator foi a longevidade do sensor, que poderia ser usado para 5 dias, mas o período de equilíbrio do sensor aumentou para dez horas enquanto o Dexcom STS era de duas horas, o que significa que o paciente precisava usar o método de automonitoramento durante esse período de tempo. Uma vantagem desse dispositivo era que o receptor também continha uma unidade funcional para mensurar glicose no sangue, permitindo que um indivíduo confirme seu nível de glicose com a picada do dedo. O Freestyle Navigator foi retirado do mercado em 2013 devido ao último produto da Abbott, o Freestyle Libre Pro Flash® (FAD, 2017).

2.3.1.4 Dispositivo Dexcom G4 Platinum

O novo dispositivo da DexCom a entrar no mercado foi o G4 Platinum em 2012, sua indicação é para pacientes de 18 anos ou mais com diabetes. O sensor possui um período de desgaste de 7 dias, com período de inicialização de 2 horas após a inserção do sensor. A distância entre o receptor e transmissor aumentou para um máximo de 7 metros, sendo que o modelo anterior possuía distância máxima de 2 metros para recepção de sinal do transmissor. Ainda é necessária calibração a cada 12 horas. Em junho de 2015 recebeu aprovação da FDA para uso pediátrico em pacientes de 2 a 17 anos com diabetes. Alguns meses depois, a Dexcom também recebeu aprovação da FDA para o lançamento da plataforma móvel, que permite a transmissão dos dados apresentados para um dispositivo móvel compatível (FAD, 2017).

2.3.1.5 Dispositivo FreeStyle Libre Pro Flash

O lançamento do novo dispositivo SMCG da Abbott recebeu aprovação da FDA em 2016 e, a princípio, era um sistema indicado para uso exclusivo de profissionais da saúde com prescrição para pacientes acima de 18 anos com diabetes. O sistema não requer calibração do usuário utilizando sangue, e o sensor é capaz de armazenar dados de glicose durante 14 dias em intervalos de 15 minutos ao longo do dia (FAD, 2017).

O Freestyle Libre é usado para analisar e avaliar as leituras de glicose do paciente, juntamente com um programa no computador para gerenciamento da diabetes, e utiliza a mesma tecnologia do modelo anterior para detecção da glicose (FAD, 2017).

2.3.1.6 Dispositivo MiniMed iPRO2

O sistema da Medtronic MiniMed chamado "iPro2" recebeu aprovação da FDA em 2016 e é indicado para gravar níveis de glicose intersticiais em pacientes com diabetes mellitus, mas apenas para complemento. No sistema de monitoramento de glicose iPro2, os resultados de dados em tempo real não estão disponíveis diretamente aos pacientes. Os dados coletados são projetados para serem revisados pelo médico após o intervalo registrado que pode ser de até seis dias. É composto por um gravador e o sensor de glicose inserido no subcutâneo, sendo o gravador aprovado para aplicativos suplementares com a monitoração contínua de glicose da Medtronic MiniMed. O sistema e o sensor foram aprovados com o sistema 530G, que é a tecnologia da bomba de insulina da Medtronic (FAD, 2017).

2.4 LIMITAÇÕES ATUAIS

Os sistemas de monitoramento contínuo da glicemia foram lançados no mercado nas últimas duas décadas, mas a precisão continua sendo um desafio. Muitos dos dispositivos atualmente no mercado exigem uma amostra de sangue para calibração ou confirmar o nível de glicose exibido no SMCG, para posteriormente iniciar a intervenção adequada e mais precisa, portanto, não ocorre substituição completa do método que utiliza lancetadores para obter amostra de sangue (MESSER, 2017).

O procedimento de perfuração do dedo na técnica de automonitoramento continua sendo a principal queixa dos pacientes quando se trata de terapia com insulina. Mas juntamente com as novas tecnologias, profissionais e os seus pacientes necessitam de treinamento adequado para ser capaz de usar esses dispositivos médicos de forma confortável e efetiva (DAVEY, 2010).

Uma limitação reportada dos dispositivos SMCG é o tempo de atraso do sensor referente às mudanças na glicemia em relação ao fluido intersticial. Este tempo de atraso foi documentado para estar entre 4 e 27 minutos, afetando a precisão do

dispositivo e colocando os pacientes em risco de sobredosagem na terapia com insulina (DAVEY, 2010).

Segundo os resultados da pesquisa realizada por Davey (2010), foi sugerido que os tempos de atraso podem ser explicados em grande parte pela inércia do próprio SMCG e a fisiologia, observando que o próprio dispositivo possui tempo de atraso, além do retardo fisiológico entre fluido intersticial e corrente sanguínea, considerado um elemento importante para novas pesquisas. Devido aos tempos de atraso "longos" para alguns SMCGs atuais no mercado, a leitura da glicose padrão é ainda necessária antes de uma intervenção.

Sinha et al. (2017) compararam os atrasos de três sistemas contínuos de monitoramento de glicose, e observaram a variabilidade entre a população adulta versus a população adolescente. O estudo avaliou o tempo de latência do G4 Platinum pela Dexcom, o Freestyle Navigator, e o Sensor Enlite da Medtronic Minimed. Os dados do grupo adolescente apresentaram um tempo de atraso mais curto em relação à população adulta, o G4 Platinum apresentou atraso do sensor de $\pm 8,1$ minutos, o Freestyle Navigator apresentou atraso de $\pm 10,8$ minutos, e o Enlite $\pm 8,3$ minutos. Uma das limitações do artigo foi que os dispositivos avaliados não foram as versões mais recentes disponíveis no mercado.

O tempo de atraso pode causar uma grande variedade de complicações, criando uma superestimação ou mesmo uma subestimação da glicemia mensurada, podendo ser um problema quando o paciente está passando por um evento de hipoglicemia e hiperglicemia. Com o tempo de atraso, os pacientes podem também induzir inadvertidamente hipoglicemia injetando doses adicionais de insulina quando não observam uma redução no valor da glicemia (GHILONI et al., 2017).

A bomba de insulina que é compatível com o dispositivo SCMG deve levar em consideração o atraso da leitura, portanto, calibrações apropriadas do dispositivo ajudariam a minimizar o tempo de atraso. A partir de dezembro 2016, a FDA aprovou o uso do G5 Mobile CGM da Dexcom, substituindo o teste de glicose no sangue em pacientes com idade a partir de 2 anos (GHILONI et al., 2017).

2.5 FUTURO: SISTEMA DE CIRCUITO FECHADO

A FDA aprovou diversos SMCG nas últimas duas décadas, mas algumas empresas estão desenvolvendo sistema de "circuito fechado", ou seja, inclui um dispositivo SMCG e uma bomba de insulina, o que permitiria monitoramento da glicemia e administração de terapia com insulina pelo sistema. A bomba de insulina pode administrar uma quantidade pré-definida de insulina ao longo do dia inteiro, trabalhando de forma semelhante como o pâncreas de uma pessoa, dado o nome da tecnologia como um "pâncreas artificial" (OLCZUK et al., 2017).

Foram criadas bombas de insulina com aprovação da FDA que são compatíveis com os atuais sistemas SCMG no mercado. Em 2016 a Medtronic MiniMed lançou o sistema MiniMed 670G, sendo o primeiro sistema de circuito fechado híbrido aprovado pela FDA que é capaz de monitorar a glicose, bem como ajustar o valor de insulina de ação curta e prolongada, com base nas leituras do sensor Guardian, o operador também pode seguir um manual em que a insulina será liberada a uma taxa pré-determinada definida. O progresso tem sido lento e a pesquisa continua com alguns desafios que incluem: acurácia nas leituras dos dispositivos, incapacidade de absorção de alguns tipos de insulina e ajustar a quantidade de insulina liberada para ser consistente com o dispositivo (OLCZUK et al., 2017; BURGE et al., 2008).

2.6 SÍNDROME METABÓLICA EQUINA

A desregulação da insulina é o fator marcante da síndrome metabólica equina, e recebeu atenção devido à sua associação direta com a laminite. Na ausência de um tratamento adequado para a laminite, é necessário um foco na profilaxia, fazendo com que a detecção precoce de indivíduos em risco de desenvolver laminite, seja um dos principais desafios na endocrinologia equina (BERTIN et al., 2017).

Estudos recentes mostraram que a desregulação da insulina vai além da resistência à insulina tecidual, e agora é demonstrado que o eixo entero-insular desempenha um papel importante na secreção de insulina e hiperinsulinemia equina. Diversos testes, atualmente, estão disponíveis para diagnosticar a desregulação da

insulina em cavalos, sendo que existem testes que investigam a resistência à insulina tecidual e os que estão investigando o eixo entero-insular (BERTIN et al., 2017)

Independentemente dos testes utilizados, muitos fatores de variação como raça, dieta, estado de jejum ou estação, são identificados e podem potencialmente confundir os resultados de um teste específico. Portanto é necessária uma interpretação cuidadosa dos resultados de um determinado teste em cada situação individual para otimizar a detecção de cavalos em risco de laminite (BERTIN et al., 2017).

A síndrome metabólica equina (SME) foi descrita como uma condição que agrupa desregulação de insulina, concentrações de adipocina circulante alterada, dislipidemia (com ou sem obesidade) e uma predisposição à laminite (Frank, et al., 2014). A população mundial de cavalos obesos ou com excesso de peso está aumentando e pode alcançar, em algumas áreas, uma prevalência de até 72,2% (Menzies-Gow et al., 2016). Isso sugere que, em paralelo com o que é descrito no homem, obesidade e/ou adiposidade regional está relacionado aos distúrbios endócrinos (TATCHER et al., 2012; GEOR et al., 2009).

A fisiopatologia da SME ainda não está clara, no entanto foi demonstrado que a infusão de insulina pode desencadear laminite em cavalos saudáveis, estabelecendo uma ligação entre hiperinsulinemia e laminite (ASPLIN et al., 2007). Os termos desregulação de insulina e resistência à insulina foram utilizados indiferentemente, mas desregulação de insulina é um termo mais amplo, já que abrange tanto a resistência à insulina tecidual persistente ou hiperinsulinemia intermitente (FRANK et al., 2014).

A resistência à insulina nos tecidos é a incapacidade dos tecidos para responder adequadamente à insulina, enquanto a hiperinsulinemia é a circulação de uma quantidade inapropriada de insulina após um estímulo dado (SUAGEE et al., 2011). A hiperinsulinemia pode ser um sintoma da resistência à insulina tecidual, e ocorre como resposta compensatória à resistência insulina de tecido periférico. No entanto, pesquisas recentes sobre o eixo entero-insular equino demonstraram que os cavalos podem apresentar resposta excessiva de insulina ao ingerir carboidratos (sem resistência simultânea à insulina tecidual), o que resulta em hiperinsulinemia transitória e demonstra que a hiperinsulinemia pode estar presente na ausência de resistência à insulina tecidual (DE LAAT et al., 2016).

A resistência à insulina tecidual e a hiperinsulinemia podem representar duas possibilidades de um processo fisiopatológico da laminite. A ligação direta entre insulina e laminite permanece desconhecida, pois não está esclarecido se existe um efeito local ou sistêmico (WALLER et al., 2011). Alguns mecanismos para explicar a laminite associada à insulina foram propostos, como um efeito mitogênico nas células epiteliais lamelares, inflamação crônica induzida pela obesidade, desencadeando ativação de neutrófilos e produção de citocinas pró-inflamatórias ou disfunção vascular, resultando em hipóxia e ativação endotelial (DE LAAT et al., 2013).

Embora a laminite tenha movimentado a indústria equina por muitos anos, nenhum tratamento adequado está disponível e o desenvolvimento da laminite ainda está associada a uma diminuição da sobrevivência após 1 ano de início (MCGOWAN et al., 2004). Cavalos com SME, podem apresentar alterações radiográficas pré-existentes ou anormalidades de crescimento em seus cascos, antes do primeiro episódio reconhecido de laminite, portanto é necessário prevenir o desenvolvimento do primeiro episódio de laminite, e a detecção precoce de cavalos em risco é extremamente importante (BERTIN et al., 2017; KARIKOSKI et al., 2011).

À medida que novas descobertas sobre a desregulação de insulina são reunidas, novos testes são desenvolvidos, e a interpretação de testes mais antigos sofrem alterações. O teste ideal seria capaz de detectar cavalos nos estágios iniciais da desregulação de insulina, e precisaria ter um valor intrínseco forte correlacionado (BERTIN et al., 2017).

2.7. DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA À INSULINA

As técnicas utilizadas para avaliar o grau de sensibilidade do tecido à insulina em cavalos e pôneis são adaptadas principalmente da medicina humana. Enquanto muitos destes testes estão disponíveis, eles continuam sendo refinado para uso na espécie equina (BERTIN et al., 2017).

2.7.1 Concentração de Glicose no Sangue em Jejum

A hiperglicemia é um método indireto de avaliar resistência à insulina nos tecidos. O cavalo pode produzir grandes quantidades de insulina e raramente desenvolve insuficiência exócrina no pâncreas, portanto a hiperglicemia sugere uma compensação defeituosa de resposta à insulina e, se for persistente, justifica a investigação (FRANK et al., 2010).

A concentração de glicose em cavalos com SME está acima do limite superior basal, mas existem diversas causas de hiperglicemia, como estresse, alimentação, administração de fármacos ou doença concomitante. Além disso, o tempo do jejum deve ser considerado para avaliação da dinâmica glicêmica, pois diversos estudos divergem sobre o tempo de jejum, variando de 12 a 72 horas. Assim, a glicemia no jejum é um pobre teste de diagnóstico para resistência à insulina tecidual com baixa especificidade e baixa sensibilidade (BERTIN et al., 2016; FRANK et al., 2010; KRONFELD et al., 2005).

2.7.2 CLAMP hiperinsulinêmico e euglicêmico

O *Clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico (CHE) foi desenvolvido em 1974 por Sherwin, e ainda é considerado o "padrão-ouro" para diagnosticar resistência à insulina tecidual em medicina humana (PARK et al., 2015). Este teste, conforme descrito por Kronfeld et al. (2005), também foi considerado como o "padrão-ouro" para o diagnóstico de resistência à insulina tecidual em cavalos. Inicialmente o cavalo recebe uma infusão contínua de insulina (3-6 μ U/min/kg) durante 180 minutos, e a glicose no sangue é mantida a um valor constante de (90 mg/dL), ajustando a taxa de infusão de glicose quando ocorre variações acima de 4 mg/dL (PRATT et al., 2005).

A taxa de infusão de glicose é ajustada para equilibrar a glicemia além do metabolismo, fornecendo a taxa de depuração de glicose induzida pela insulina. Uma baixa taxa de infusão de glicose indica resistência à insulina tecidual, enquanto uma alta taxa de infusão indica uma eliminação efetiva de glicose induzida pela insulina e consequentemente boa sensibilidade à insulina (PRATT et al., 2005). Embora este

teste forneça informação da capacidade dos tecidos para responder a insulina exógena, a interpretação deste teste pode ser difícil devido referência específica da raça. Por exemplo, em uma população geral de cavalos, um valor de infusão inferior a 0,13 mg/dL/kg/min é indicativo de resistência à insulina tecidual, mas nos cavalos Warmblood holandeses somente valores inferiores a 0,26 mg/dL/kg/min indicariam resistência à insulina nos tecidos (KRONFELD et al., 2005).

O teste do CHE pode ser muito extremo para refletir os processos fisiológicos, requer várias horas com equipamentos adequados para alcançar um estado estacionário, é limitado a grandes centros de pesquisa, e frequentemente é usado como referência para comparar outros testes, porém possui coeficiente de variação para repetibilidade de 14% (PRATT et al., 2015).

2.7.3 Teste de sensibilidade à insulina

O teste de sensibilidade à insulina (TSI) avalia diretamente a capacidade de sensibilidade da insulina nos tecidos, como músculos esqueléticos, tecido adiposo e fígado. Diferentes versões deste teste foram descritas, um teste completo e um curto (BERTIN et al., 2013). O teste completo, conforme descrito por Caltabillota et al. (2010), avalia a sensibilidade à insulina medindo a glicemia após injeção intravenosa de doses variáveis de insulina (20-125 ml U/kg) durante 5 horas.

O teste curto possui duas etapas, conforme descrito por Bertin et al. (2013), e avalia a sensibilidade à insulina através da medição da glicemia 30 minutos após injeção de 100 mIU/kg de insulina. Para ambos os testes, uma diminuição de 50% na glicemia indica sensibilidade à insulina. Esse teste mostrou-se excelente, sugerindo que a versão curta do teste de tolerância à insulina poderia ser usada à campo. O teste comporta um pequeno risco de induzir hipoglicemia acentuada, no entanto os sinais clínicos de hipoglicemia raramente requerem tratamento (EILER et al., 2005).

2.7.4 Teste de tolerância à glicose intravenosa

Duas versões do teste de tolerância à glicose intravenosa (TTGI) foram descritos, o primeiro baseado em infusão de glicose e o outro em infusão de glicose seguida por insulina (TTGI modificado) (BERTIN et al., 2017).

No modelo descrito por Pratt et al. (2005), 500 mg/kg de dextrose é injetado e até 36 amostras de sangue são coletadas ao longo de 6 horas para medir glicose e insulina. Os modelos matemáticos computadorizados são usados para descrever as respostas de glicose e insulina. Para o teste com infusão de glicose é avaliada análise mínima do modelo e área sob as curvas de glicose e insulina, permitindo assim o cálculo do índice de sensibilidade à insulina, a eficácia da glicose, a resposta aguda de insulina sobre glicose e a meia-vida da glicose. Este modelo apresentou pouca repetibilidade, com coeficiente de variação entre 24 e 30%.

Algumas mudanças foram realizadas no teste, para limitar a perda de glicose pela via urinária, resultando na infusão de doses menores de dextrose (100-300 mg/kg). O TTGI modificado, como descrito por Hoffman et al. (2003), difere do TTGI, onde a infusão intravenosa de 20-30 mIU/kg de insulina ocorre 20 minutos após infusão de dextrose, permitindo o cálculo da sensibilidade à insulina (SI). O diagnóstico de resistência à insulina tecidual é determinado quando SI é baixa (<1 L/min/mIU), enquanto que um cavalo é classificado como sensível à insulina com um SI elevado ($> 1,5$ L/min/mIU) (BURNS et al., 2010). O teste TTGI modificado tem sido amplamente utilizado em configurações de pesquisa e é muitas vezes considerado como um novo "padrão-ouro" para a avaliação de resistência à insulina em cavalos (CARTER et al., 2010).

2.7.5 Teste combinado de glicose e insulina

O teste combinado de tolerância de glicose e insulina (TCGI) foi desenvolvido como um modelo simplificado do (TSI) e do (TTGI), conforme descrito por Eiler et al. (2005), e baseia-se na infusão simultânea de 150 mg/kg de dextrose e 0,1 UI/kg de insulina. São coletadas amostras de sangue por 150 minutos, totalizando quatorze

glicemias, esse modelo de injeção simultânea de glicose e insulina resulta em uma curva bifásica, com uma fase positiva (hiperglicemia relativa) e uma fase negativa (hipoglicemia relativa). A interpretação do teste é baseada na duração da fase positiva (resistência à insulina tecidual), onde a hiperglicemia ocorre por mais de 45 minutos ou a concentração de insulina após 45 min é de 100 UI/mL) (ARGO et al., 2012).

A repetibilidade do teste é semelhante a outros testes com um coeficiente de variação em torno de 15%, no entanto, usando a duração da fase positiva, a sensibilidade e a especificidade do TCGI mostrou ser 85,7% e 40% respectivamente (usando o TTGI como referência) e usando o valor de insulina em 45 minutos, a sensibilidade e especificidade do TCGI é de 28,5 e 100%, respectivamente (DUNBAR et al., 2016).

2.7.6 Testes de substituição

Para simplificar o diagnóstico de resistência à insulina tecidual nos cavalos, foram desenvolvidos alguns testes de substituição, esses testes são amplamente usados na medicina humana e é atraente para veterinários de equídeos, visando um diagnóstico de resistência à insulina tecidual com base em testes limitados em um ambiente de campo (GUNGOR et al., 2004).

Em cavalos, a relação glicose/insulina demonstrou ser uma boa estimativa de sensibilidade insulínica, e a relação insulina/glicose mostrou-se correlacionada com secreção de insulina medida pelo CHE (FRANK et al., 2010). Uma proporção de glicose/insulina <10 sugere resistência à insulina enquanto que uma proporção de glicose/insulina $<4,5$ indica resistência à insulina grave ou descompensada (Frank et al., 2011). No entanto, em outro estudo, essa relação não identificou cavalos diagnosticados como resistentes à insulina por outros testes (BERTIN et al., 2016).

2.8. DIAGNÓSTICO DE HIPERINSULINEMIA

2.8.1 Concentração basal de insulina

A concentração basal de insulina é caracterizada como hiperinsulinemia quando os valores em jejum são maiores que 20 UI/mL, ou maiores que 60 UI/mL se alimentados. Na presença de suspeita clínica de SME é sugerido o teste dinâmico (HART et al., 2016). Por outro lado, uma concentração de insulina dentro do intervalo de referência na presença de suspeita clínica de SME, não é considerado positivo. Em alguns estudos, cavalos diagnosticados com desregulação de insulina por outros testes, não foram confirmados como hiperinsulinêmicos quando especificamente comparado com o teste TTGI (DUNBAR et al., 2016).

Embora um único ponto no tempo da hiperinsulinemia não seja sensível para o diagnóstico da desregulação da insulina, a hiperinsulinemia espontânea está associada ao desenvolvimento de laminite. Cavalos que sofrem de endocrinopatias, e com insulina sérica basal acima de 188 UI/ml, apresentaram sensibilidade e especificidade maior que 90% para prever a laminite (ASPLIN et al., 2007). Em outro estudo, cavalos sem histórico de laminite, com insulina sérica basal acima de 21,8 μ U/mL, apresentaram sensibilidade e especificidade de 70% para prever a ocorrência de laminite dentro de 3 anos (MENZIES-GOW et al., 2016).

2.8.2 Teste de açúcar oral

O teste de açúcar oral (TAO), investiga a resposta de insulina induzida pela glicose para a administração oral de carboidratos não estruturais (BORER et al., 2012). O diagnóstico de hiperinsulinemia com TAO, conforme descrito por Schuver et al. (2014) é baseado em insulina sérica acima de 60 μ U/mL, após 60 ou 90 minutos da administração oral de 0,15 mL/kg de xarope de milho a cavalos que permaneceram em jejum durante a noite. Este teste mede a resposta de insulina após uma dose oral de carboidratos, mas a interpretação dos resultados pode ser difícil, pois alguns

estudos encontraram coeficiente de variação de 40% (KNOWLES et al., 2017). Além disso, quando comparado com os testes padrão ouro, teve uma sensibilidade de 0%, o que limitaria enormemente o potencial valor clínico do teste (BERTIN et al., 2017).

2.8.3 Teste oral de glicose

O xarope de milho não está disponível em todas as regiões do mundo, então foi desenvolvido o teste oral com glicose (TOG) (JOSE-CUNILLERAS et al., 2002). O diagnóstico de hiperinsulinemia com o TOG, é baseada em concentrações de insulina acima de 80 $\mu\text{U/mL}$ após 120 minutos da administração oral de 0,75-1 g/kg de glicose (DE LAAT et al., 2016). O método de administração da glicose varia, em alguns estudos, a dextrose em pó é misturada com o farelo e, em outros, a glicose é administrada através de sonda nasogástrica. Independentemente do método de administração, o TOG tem uma melhor repetibilidade do que o TAO, com um coeficiente de variabilidade em torno de 20%. Este teste também mostrou correlação com os resultados do CHE e o TCGI modificado. A facilidade do teste e a capacidade de determinar com precisão a dose de glicose administrada podem impactar positivamente a "repetibilidade" (BERTIN et al., 2017).

2.9. DIAGNÓSTICO DE DESREGULAÇÃO DE INSULINA

2.9.1 Combinação de testes

O diagnóstico de desregulação da insulina, pode ser realizado por demonstração de resistência à insulina tecidual ou hiperinsulinemia, alguns cavalos desenvolvem resistência à insulina na ausência de hiperinsulinemia compensatória (diminuição da absorção de tecido periférico) e outros podem desenvolver hiperinsulinemia na ausência de resistência à insulina tecidual (efeito de absorção

intestinal inapropriada), enquanto alguns cavalos desenvolvem hiperinsulinemia e resistência à insulina tecidual (DE LAAT et al., 2016).

O problema com os testes atuais é que eles apenas investigam uma etapa da doença, conseqüentemente pode ocorrer de cavalos não serem diagnosticados e encaminhados para tratamento. Além disso, uma vez que o valor intrínseco dos diferentes testes é calculado com base nos resultados do CHE ou TGCI modificado, é possível que a baixa sensibilidade de alguns testes seja explicada pelo fato de que as provas não estavam investigando o mesmo eixo da desregulação insulínica (DUNBAR et al., 2016). Portanto, pode ser recomendável que o diagnóstico da desregulação de insulina seja feito de forma escalonada, começando com valores basais de insulina e glicose e terminando com combinação de testes que diagnosticam resistência à insulina tecidual, bem como testes que avaliam o eixo entero-insular (BERTIN et al., 2017).

Para melhor compreensão da desregulação da insulina, novos alvos, além de insulina e glicose, foram estudados para facilitar o diagnóstico precoce. Estudos da literatura humana demonstraram a importante função do intestino após a ingestão de carboidratos em estimular a liberação de insulina e esse efeito também foi demonstrado em cavalos (DE LAAT et al., 2016). As duas principais incretinas que foram investigadas em cavalos são: o peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) e peptídeo insulínico dependente de glicose (CHAMEROY et al., 2016). O GLP-1 é secretado pelas células L pancreáticas após ingestão de carboidratos e aumenta a secreção de insulina estimulada pela glicose pelas células β pancreáticas (HOLZ et al., 1993).

O GLP-1 plasmático tem mostrado forte correlação com a secreção de insulina em cavalos (BANFORD et al., 2015) entretanto, em um estudo, as concentrações plasmáticas de GLP-1 não diferiram entre cavalos do grupo controle e cavalos diagnosticados com SME, mesmo quando os cavalos foram alimentados com uma dieta rica em carboidratos (CHAMEROY et al., 2016).

A função do GIP tem sido investigada com menos frequência em cavalos, mas também é secretada após a ingestão de carboidratos, embora nenhuma diferença no plasma tenha sido encontrada após uma dose de glicose oral em pôneis diagnosticados com resistência insulínica. O estímulo de secreção insulínica pós-prandial por incretinas é importante, pois essa via pode ser um alvo para o tratamento

de SME, mas o efeito parece ser menor nos cavalos do que no homem (DE LAAT et al., 2016).

A pró-insulina é dividida em peptídeo C e insulina e, ao contrário da insulina, o peptídeo C não passa primeiramente através do fígado, aumentando sua meia vida para seis vezes mais o de insulina. Nos cavalos, demonstrou-se que respostas de insulina exageradas a um TGO, também resultam significativamente em concentrações elevadas do peptídeo C, sugerindo que poderia ser usado para avaliar a secreção pancreática e a disfunção nesta espécie (TOTH et al., 2010).

A adiponectina é uma citocina anti-inflamatória produzida por adipócitos, e possui participação na regulação da glicose (ANTUNA-PUENTE et al., 2008). Estudos mais recentes demonstraram que a adiponectina plasmática poderia ser útil, mas a concentração de adiponectina e o índice de escore corporal não apresentam correlação em cavalos (KEAMS et al., 2006). Também foi demonstrado que cavalos alimentados com dieta rica em carboidratos apresentam redução da adiponectina plasmática, demonstrando que a dieta pode ser mais importante do que o peso corporal para redução de adiponectina plasmática (BAMFORD et al., 2016). A concentração de adiponectina menor que 2,5 µg/mL mostrou ter uma sensibilidade e uma especificidade de 80% para prever a ocorrência de laminite dentro de 3 anos, sugerindo que a adiponectina poderia ser valiosa no diagnóstico de desregulação de insulina, além da obesidade (BERTIN et al., 2017).

A leptina tem sido associada à diminuição da sensibilidade à insulina (Frank et al., 2006), entretanto, em vez de sensibilidade à insulina, o aumento de leptina pode estar associado ao aumento do escore da condição corporal. A concentração de leptina maior que 7,3 ng/ mL, apresentou sensibilidade de 63-83% na predição da ocorrência de laminite (CARTER et al., 2009).

A hipertrigliceridemia foi relatada como um componente da SME e, portanto, um fator de risco para laminite. No entanto, dados recentes mostram que nem todos os cavalos obesos possuem SME, podendo esses animais obesos serem metabolicamente saudáveis. A concentração de triglicerídeos, frequentemente correlacionada com o escore da condição corporal, pode não ser um marcador muito específico de desregulação de insulina e, portanto, não é um valioso preditor de laminite (DE LAAT et al., 2016).

Os marcadores morfométricos são uteis para determinar a aparência física do cavalo, que tem sido associada à desregulação insulínica, e pesquisas extensas foram

realizadas para elaborar um escore de condição corporal equina (Martinson et al., 2014). A avaliação de escore corporal é classificada por pontuação, e essas avaliações são utilizadas para correlacionar-se com o estado metabólico e a ocorrência de laminite (MARTIN-GIMENEZ et al., 2016). Carter et al. (2009) observaram que cavalos com escore de condição corporal entre 7-9, apresentam uma sensibilidade de 100% e especificidade de 29-44% para prever a laminite, enquanto que a pontuação da crista do pescoço maior do que 4, tinha uma sensibilidade de 50-83% e uma especificidade de 78-80% para prever laminite.

A sensibilidade relativamente baixa e a especificidade desses testes, confirmam os achados clínicos de que alguns cavalos obesos não apresentam desregulação de insulina, e que alguns cavalos magros podem apresentar desregulação severa da insulina, contrariamente ao que foi pensado por um longo tempo, e o aumento da pontuação da condição corporal pode não alterar a regulação da insulina (CARTER et al., 2009).

2.9.2 Fatores de interferência

Apesar da variabilidade óbvia induzida pelo ensaio utilizado para medir glicose, insulina ou outros metabolitos, a interpretação de diferentes testes também podem ser alterados por fatores relacionados ao cavalo e ambientais (BERTIN et al., 2017).

O principal fator de variabilidade durante o teste é o próprio cavalo. Em quase todos os estudos há um efeito significativo do indivíduo com frequentes outliers, limitando a generalização dos dados, reduzindo a importância do monitoramento em cavalos apresentando resultados equivocados (BAMFORD et al., 2015; BORER-WEIR et al., 2013). Outro fator de variação, conforme descrito acima com o CHE, é a raça. Bamford et al. (2015) observaram maiores evidências de desregulação de insulina em pôneis e cavalos Andaluz quando comparados a raça American Trotter, portanto é necessário que estudos mais específicos para raças sejam realizados, assim como os estudos do genoma, ajudando a estabelecer uma base genética para desregulação de insulina (LEWIS et al., 2017).

Vários estudos encontraram variação sazonal na avaliação da desregulação insulínica, devido ao aumento do carboidrato não estrutural na grama durante as

estações de elevadas temperaturas e índices pluviométricos, que pode explicar a relativa hiperinsulinemia, a relação potencial entre SME e disfunção da glândula pituitária (que também é afetada sazonalmente), justificando novas pesquisas, especialmente em cavalos mais velhos (FRANK et al., 2014). Outro fator importante de variabilidade durante o teste é o jejum do cavalo, onde níveis de insulina maior que 20 UI/mL sugerem a desregulação da insulina, e após a alimentação, a insulina maior que 60 UI /mL seria sugestivo de desregulação da insulina (HART et al., 2016).

2.10 UTILIZAÇÃO DOS TESTES EM EQUINOS

Nos cavalos que apresentam condições crônicas associadas com diminuição da sensibilidade à insulina, laminite, disfunção hipofisária e hiperlipemia, o teste combinado de insulina-glicose (TCIG) representa um método prático de avaliação da homeostase sanguínea, que incorpora a administração tanto de glicose quanto de insulina. Nesses casos, protocolos que minimizam manipulação de pacientes e múltiplas aquisições de amostras de sangue podem melhorar a precisão diagnóstica do TCIG, pois o estresse pode contribuir para diminuir a sensibilidade à insulina (JOHNSON, 2011).

A hipoglicemia e a hiperglicemia extrema na rotina hospitalar também foram identificadas como fatores prognósticos em potros neonatos criticamente doentes e em cavalos adultos. A mensuração utilizando glicosímetros portáteis em amostras de sangue venoso, arterial ou capilar requer coleções de sangue invasivas repetidas, associado ao manuseio e restrição do animal, podendo ser estressante ou doloroso para o paciente e, em longo prazo, pode levar a complicações como tromboflebite da veia jugular (WAITT, 2009).

Vários estudos em humanos e animais indicam que a glicose intersticial possui correlação com a glicose sanguínea, mas poucos estudos abordam o uso clínico de monitoração contínua da glicose intersticial em equinos (WIEDMEYER, 2003).

Wiedmeyer et al. (2005) padronizaram a utilização do aparelho Medtronic Minimed® para monitoração contínua de glicose em equinos. Neste estudo foram utilizados sete cavalos adultos hígidos, a resposta glicêmica foi avaliada com o teste combinado de glicose e insulina e os resultados comparados aos dados de glicose

intersticial. Johnson et al. (2011) avaliaram o aparelho Medtronic Minimed® em sete pôneis obesos, determinando a dinâmica glicêmica após o teste de TCGI. Os dois estudos concluíram o tempo de atraso médio de 15 minutos para leitura, o que corresponde ao atraso fisiológico proposto por KEENAN et al. (2013).

Hug et al. (2013) utilizaram o dispositivo The Guardian® para monitorar a glicemia de potros neonatos hospitalizados em condições clínicas críticas, concluindo que o aparelho é útil para avaliação glicêmica em equinos, porém deve ser considerado o tempo de atraso nas leituras e calibração periódica do leitor.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi padronizar a utilização do aparelho FreeStyle Libre na monitoração contínua instantânea da glicose intersticial em equinos, e avaliar sua aplicabilidade e precisão em equinos durante o teste combinado de glicose e insulina (TCGI).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A execução deste experimento foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e sua autorização registrada em 22/11/2017 em documento CEUA nº 2969130917.

4.1 ANIMAIS

Utilizou-se, na execução deste experimento, 10 equinos, sendo nove da raça Quarto de Milha e um da raça Puro Sangue Árabe, machos não castrados, adultos (entre três e dezessete anos), sendo cinco não obesos e cinco obesos. Todos cavalos são provenientes de propriedades particulares, nas cidades de Tabatinga-SP e Campinas-SP.

Os animais selecionados foram previamente submetidos a exame físico, e coleta de sangue por venopunção jugular, as amostras foram acondicionadas em tubos com EDTA, refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório de CBI Análises Clínicas, onde foram realizados exame de hemograma para atestar a sanidade dos animais. No experimento foram incluídos os animais que apresentaram-se saudáveis na avaliação clínica, hematológica, e que não apresentaram alterações incompatíveis com os procedimentos de experimentação.

Os animais eram alimentados com média proporção de (concentrado:volumoso), constituída de 50% concentrado comercial peletizado e 50% de feno, (*Cynodon dactylon* (L.) Pers cv. Tifton 85), usando como base a referência de 2% do peso corporal, e estabulados em baias com 3 x 4 metros.

4.2 AVALIAÇÃO DE CONDIÇÃO DE ESCORE CORPORAL

A avaliação do escore corporal segundo Henneke (1983) foi utilizada como critério de inclusão para definição dos grupos estudados, com o grupo 1 composto por animais hígados (Grupo hígado) com escore corporal 5 ou 6, e o grupo 2 composto por animais obesos de escore corporal acima de 7 (Grupo obeso), sendo:

- 1- Emaciado: Processo espinhoso, costela, inserção da cauda. Ílio e ísquio proeminentes. Estrutura óssea da cernelha, espádua e pescoço facilmente visíveis. Não se observa presença de gordura em nenhuma parte do corpo animal.
- 2- Muito magro: Gordura cobrindo a base dos processos espinhosos. Extremidade dos processos transversos das vértebras lombares arredondadas. Costelas, inserção da cauda, ílio e ísquio proeminentes. Estruturas ósseas da cernelha, espádua e pescoço menos visíveis.
- 3- Magro: Gordura cobrindo a metade dos processos espinhosos. Processos transversos das vértebras lombares não são palpáveis. Pouca gordura cobrindo as costelas. Processo espinhoso e costelas facilmente visíveis. Inserção de cauda proeminente, porém, as vertebrae não são visíveis. Íleo e ísquio arredondados, porém ainda visíveis. Estruturas ósseas da cernelha, espádua menos visíveis.
- 4- Moderadamente magro: Sulco ao longo da região lombar. Espaço entre as costelas visíveis. Gordura pode ser palpada na inserção da cauda, e sua proeminência depende da conformação do animal. Ílio e ísquio não são visíveis. Estrutura óssea da cernelha, espádua com alguma cobertura de gordura.
- 5- Moderado (ideal): Costelas não são visíveis, porém, facilmente palpadas. Gordura na inserção da cauda se torna esponjosa. Cernelha arredondada, cobrindo o processo espinhoso. Espádua e pescoço ligados suavemente ao corpo do animal.
- 6- Moderadamente gordo: Pode haver um sulco suave ao longo do dorso/lombo. Gordura cobrindo as costelas. Gordura mais macia na inserção da cauda. Gordura começa a ser depositada atrás e sobre a espádua e pescoço.
- 7- Gordo: Pode haver um sulco suave ao longo do dorso/lombo. Costelas podem ser palpadas individualmente, com depósito de gordura entre elas. Gordura

mais macia na inserção da cauda. Gordura depositada atrás e sobre a espádua e pescoço.

- 8- Obeso: Depressão ao longo do dorso/lombo. Costelas são difíceis de serem palpadas. Gordura da inserção da cauda torna-se muito macia. Área ao redor da cernelha e atrás da espádua com muita gordura. Pescoço espesso. Gordura depositada na parte interna e posterior das patas traseiras do animal.
- 9- Muito obeso: Depressão evidente ao longo do dorso/lombo. Acúmulo de gordura sobre as costelas, formado placas. Acúmulo de gordura sobre a inserção da cauda, atrás da espádua e pescoço, formando dobras na pele. Gordura depositada na parte interna e posterior das patas traseiras do animal, formando dobras.

4.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS E PROCESSAMENTO

Nos animais dos grupos 1 e 2 foram colocados os sensores do aparelho FreeStyle Libre para monitoração da glicose no fluido intersticial. O sensor foi aplicado na região dorsolateral do terço inicial do pescoço (Figura 3). Para aplicação do sensor foi realizada tricotomia de 7 x 7 centímetros, assepsia com clorexidina degermante 2%, e posteriormente, clorexidina em solução alcoólica 0,5%. Para melhor fixação foi utilizado na bordadura do sensor cola a base de cianoacrilato e, para proteção, fita adesiva hipoalergênica, conforme descrito por Johnson et al. (2011).

Figura 3 – Ponto de aplicação e fixação do sensor para monitoração da glicose intersticial.

Fonte: (FRANÇOSO, 2018).

Para os animais do grupo1 (saúdáveis não obesos), foram apenas comparados os valores laboratoriais com os do parêlho e testado o tempo de permanência do sensor.

O sensor era aplicado antes da primeira refeição do dia, e a primeira leitura foi realizada com o animal em jejum após 1 hora de estabilização do sensor conforme preconizado pelo fabricante. Assim, os tempos definidos para leitura foram: T0 (jejum), T1 (2 horas após refeição), T2 (4 horas após refeição), T3 (6 horas após refeição), T4 (8 horas após refeição e T5 (10 horas após refeição) para ambos os grupos, totalizando 10 horas de leitura.

Nos tempos de leitura também foram coletados amostras sanguíneas para mensuração da glicemia para comparação com método enzimático padrão. As coletas foram realizadas por venopunção da jugular esquerda, e acondicionadas em tubos com fluoreto de sódio, as amostras foram centrifugadas a 1500 x g durante 15 minutos, para separação de plasma, acondicionadas em microtubo de 2 mL, e congeladas a – 80° C para posterior análise.

Após as coletas, os animais permaneceram com o aparelho por até 7 dias, para observarmos o tempo de funcionamento na espécie, e fixação.

Os animais do grupo 2, após a primeira leitura, foram submetidos ao teste combinado de glicose e insulina (TCGI) conforme descrito por Eiler em 2005.

As amostras para as análises glicêmicas e insulinêmicas do teste TCGI foram acondicionadas em tubos estéreis com fluoreto de sódio para glicemia, e tubo sem anticoagulante para insulinemia. A coleta de sangue foi por venopunção da veia jugular através de cateter fixado após assepsia.

Para o TCGI foi administrado solução de dextrose 50% na dose 150 mg / kg na veia jugular esquerda e insulina regular na dose 0,1 UI/kg na veia jugular direita, as amostras de sangue foram coletadas para determinação da glicose nos tempos 0 (jejum), e após as infusões nos tempos: 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 minutos e para determinação da insulina nos tempos 0 e 45 minutos. Os valores de glicose foram mensurados nos mesmos tempos utilizando o sensor de leitura no fluido intersticial, com o dispositivo FreeStyle Libre.

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. As amostras foram centrifugadas a 1500 x g durante 15 minutos, para separação de plasma e soro, acondicionadas em microtubo de 2 mL, congeladas a - 80° C para posterior análise.

4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Para dosagem laboratorial de glicose foi utilizado o método glicose oxidase/peroxidase (GOD/PAP) descrito por Barham (1972), em analisador bioquímico semi-automático modelo Prietest touch interteck e kit PP ANALISA LOT 7008.

A dosagem de insulina plasmática foi analisada pela técnica de radioimunoensaio, aparelho Unicel DXL-600 ACCES Immunoassay system, kit Beckman coulter.

Para mensuração da glicose intersticial, foi utilizado o sistema de monitoramento de glicemia instantânea, com o dispositivo FreeStyle Libre® da

empresa Abbott, que é composto de um pequeno sensor redondo medindo (35 mm x 9,5 mm). O sensor possui um cateter de (0,4 mm), que foi inserido sob a pele com auxílio de um aplicador (Figura 4), o sensor possui fita adesiva na face interna para fixação na pele.

Figura 4 – Sensor com o cateter do aparelho Freestyle Libre e aplicador com sensor.

Fonte: (FRANÇOSO, 2018)

A glicose avaliada pelo sensor utiliza o método da glicose-oxidase, que mede uma corrente elétrica proporcional à concentração de glicose. O eletrodo tem uma longa cadeia de carbono que mantém a glicose oxidase e um mediador de ósmio. A detecção e limites do sensor estão entre 20 e 500 mg/dL, portanto leituras além dessa faixa não são registradas. O sistema inicia as mensurações após 1 hora da aplicação, sendo que o sensor tem de ser digitalizado pelo leitor e em 1 segundo o leitor pode mostrar instantaneamente a leitura de glicose (Figura 5). O sistema gera informações a cada minuto e as leituras, dia e noite, são coletadas, registradas e armazenadas automaticamente.

Figura 5 – Rastreamento do sensor e gráfico de leitura diária.

Fonte: (FRANÇOSO, 2018)

As avaliações de glicemia sanguínea foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Hematologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e CBI Análises Clínicas da cidade de Itápolis-SP, com exceção da avaliação da insulina, realizada no Laboratório Maricondi na cidade de São Carlos-SP.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os animais foram divididos em dois grupos: hígidos e obesos, contendo 5 animais cada grupo.

Para análise estatística foi utilizado o programa SAS 9.4 (Statistical Analysis System). Os dados foram testados quanto a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias e caso as premissas não fossem obedecidas os dados

seriam transformados. A análise de variância foi realizada utilizando o comando PROC GLM.

A dosagem de glicemia foi comparada entre os testes FreeStyle Libre (glicose intersticial) e método enzimático, e comparada entre os grupos ao longo do tempo (T0 jejum), (T1 duas horas após), (T2 quatro horas após), (T3 seis horas após), (T4 oito horas após) e (T5 dez horas após). Para isto, foi escolhido o modelo estatístico fatorial 2X2 com medidas repetidas no tempo, avaliando o efeito de teste (fator 1), efeito de grupo (fator 2) e as interações entre teste e grupo, teste e tempo, grupo e tempo. Na presença de interação foi realizado o pós-teste de Duncan para comparação de média entre os grupos.

Os valores de glicemia foram analisados para correlação de Pearson pelo procedimento PROC CORR para verificar possíveis correlações entre as variáveis analisadas dentro do grupo hígido e do grupo obeso. Foi considerado um p significativo quando $< 0,05$.

Para análise de concordância entre as técnicas, foi utilizado o método de Bland-Altman, considerando intervalo de confiança de 95%. Esses dados também foram submetidos à análise da grade erros de Clarke, considerando clinicamente aceitáveis os dados apresentados nas zonas (A+B), estas análises foram realizadas no ambiente R (CORE, 2017), com os pacotes “blandr” (DATTA, 2017) e “ega” (SCHMOLZE, 2017).

O teste de tolerância a glicose foi realizado apenas nos animais do grupo obeso e neste caso foi feita a comparação entre os testes FreeStyle Libre (glicose intersticial) e método enzimático (hexoquinase) ao longo do tempo (0, 1, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 minutos).

Foram analisados o efeito de teste e a interação entre teste e tempo. Na presença de interação, foi feito o TEST T para comparar 2 grupos. Em ambos os casos, na presença de interação. Por fim, a análise de correlação de Pearson entre os testes FreeStyle Libre (glicose intersticial) e método enzimático, foi feita pelo PROC CORR. Foi considerado um p significativo quando $< 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO GLICÊMICA ENTRE HÍGIDOS E OBESOS

Neste tópico serão descritos os resultados de glicose e insulina dos grupos após aplicados os critérios de inclusão e divisão dos grupos.

O método de avaliação de escore de condição corporal (ECC) foi utilizado para separação dos grupos (Tabela 1), no grupo hígido (H), foram incluídos animais com $ECC \leq 6$, e para o grupo obeso (O), foram incluídos os animais que apresentaram $ECC \geq 7$.

Tabela 1 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) dos valores de ECC, peso e idade dos grupos hígidos e obesos.

	HÍGIDOS	OBESOS
ECC (1-9)	5,4 ($\pm 0,48$)	7,6 ($\pm 0,48$)
PESO	463 ($\pm 29,93$)	535 ($\pm 19,49$)
IDADE	6 ($\pm 2,36$)	13,4 ($\pm 3,87$)

Na comparação glicêmica dos grupos hígidos e obesos utilizando as técnicas SMCG e enzimática, houve efeito de interação entre grupo e tempo ($p < 0,0006$) e tempo ($p < 0,0004$), e não houve interação entre grupo ($p = 0,45$), técnica ($p = 0,62$), grupo e técnica ($p = 0,28$), tempo e técnica ($p = 0,92$).

O coeficiente de correlação de Pearson entre as técnicas, para grupos hígidos e obesos, com todos os tempos (T0 a T5), foi de ($r = 0,84$) e $p < 0,0001$ (gráfico 1) e (gráfico 2).

Gráfico 1 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as glicemias (mg/dL) do grupo Hígidos, analisadas com as técnicas de Freestyle Libre e laboratorial.

Gráfico 2 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as glicemias (mg/dL) do grupo Obesos, analisadas com as técnicas de Freestyle Libre e laboratorial.

Na comparação dos grupos Hígidos e Obesos pelo teste de Duncan, todos os tempos do grupo hígido foram iguais entre si, e o T4 do grupo hígido foi igual ao T0 do grupo obeso, e no grupo obeso T0, T3 e T4 são iguais (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) de glicose (mg/dL), (SCMG e Enzimático) dos grupos hígidos e obesos ao longo do tempo.

Tempo (minutos)	Grupos	
	HÍGIDOS	OBESOS
T0	79.50 ($\pm 6,34$) ^b	98.91 ($\pm 29,68$) ^A
T1	80.00 ($\pm 16,22$) ^b	59.75 ($\pm 22,91$) ^c
T2	81.09 ($\pm 18,49$) ^b	72.08 ($\pm 15,64$) ^c
T3	76.90 ($\pm 8,71$) ^b	81.50 ($\pm 14,81$) ^b
T4	88.58 ($\pm 12,63$) ^{bA}	88.58 ($\pm 16,28$) ^{bA}
T5	79.16 ($\pm 13,06$) ^b	98.08 ($\pm 19,51$) ^A

*Na linha, médias com letras maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

*Na coluna, médias com letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

Na análise da grade de erros de Clarke dos grupos Hígidos e Obesos, com limite de confiança de 95%, os resultados apresentaram 88,89% das leituras na zona A (precisão analítica) e 9,72% na zona B, totalizando 98,61% nas zonas A + B, (Tabela 3) e (Gráfico 3).

Tabela 3 – Resultado da análise da grade de erros dos grupos Hígidos e Obesos.

Zona	Número de amostras	%
A	64	88,89%
B	7	9,72%
C	0	0,00%
D	1	1,39%
E	0	0,00%
A + B	71	98,61%

Gráfico 3— Avaliação pela análise da grade de erros do glicosímetro FreeStyle Libre em animais hígido e obesos, evidenciando 88,89% das leituras na zona A (precisão analítica) e 9,72% delas na zona b, onde 98,61% dos valores se encontram nas zonas A e B.

A concordância entre os métodos de análise de glicemia para os grupos Hígidos e Obesos está representada no gráfico de Bland-Altman (Gráfico 4), com intervalo de confiança de 95%. Houve boa concordância entre o glicosímetro Freestyle Libre e o método enzimático laboratorial, já que a maioria dos pares das medidas encontra-se dentro do limite esperado de concordância. Além disso, o número de pares que não se encontram dentro do intervalo, não foi significativo para a amostra total.

Gráfico 4 - Gráfico de dispersão para a diferença e média entre os valores de glicemia nos grupos obesos e hígidos obtidos pelos métodos (FreeStyle Libre) e enzimático (laboratorial) (as linhas verde e vermelha representam o limite superiores e inferior de concordância; a linha pontilhada representa o valor médio do viés).

5.2 TESTE COMBINADO DE GLICOSE E INSULINA

Os animais obesos foram selecionados pelo teste do ECC para inclusão e divisão de grupos, portanto, todos os animais deste grupo possuíam $ECC \geq 7$. Após avaliação de glicemia diária foram submetidos ao teste combinado de glicose insulina, para diagnóstico de resistência à insulina e avaliação do desempenho do FreeStyle Libre em condições de hiperglicemia e hipoglicemia abrupta.

Na comparação entre as técnicas de dosagem de glicose FreeStyle Libre e enzimático laboratorial, houve efeito de tempo $p < 0,0001$, tempo e técnica $p < 0,0001$. Não houve efeito de técnica $p > 0,63$. Na avaliação de insulina houve efeito de tempo $p < 0,0001$ para o T0 e T45. No grupo obeso um animal apresentou glicemia em T45 acima do basal, o valor glicêmico foi identificado no método Freestyle Libre e método enzimático, portanto, esse animal foi considerado resistente à insulina perante as duas técnicas (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Dosagem de glicemia em animal resistente à insulina ao longo do tempo, utilizando os métodos FreeStyle Libre e enzimático.

O coeficiente de correlação de Pearson entre as técnicas (Gráfico 6), para o grupo obeso submetido ao TCGI, apresentou correlação muito forte apenas nos tempos T0 ($r=0,90$), T60 ($r=0,93$), T75 ($0,93$), T120 ($r=0,84$) e T135 ($0,85$). O T0 corresponde ao período basal do teste, e os demais tempos representam a glicemia após o primeiro pico de glicemia decorrente da infusão de dextrose. Os tempos que não apresentaram correlação alta foram os que representam a glicemia imediatamente após infusão de dextrose, ou infusão para resgate dos animais que desenvolveram hipoglicemia pós infusão de insulina.

Gráfico 6 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as glicemias (mg/dL) do grupo Obesos, analisadas com as técnicas de Freestyle Libre e laboratorial.

No teste de Duncan (Tabela 4), os tempos (0 e 45) apresentam-se semelhantes, portanto, é possível utilizar o método FreeStyle Libre à campo para verificar presença de resistência à insulina em equinos. Os tempos (T1, T5, T15, T25 e T35) são distintos entre si pelo teste, a curva glicêmica aferida pelo método Freestyle Libre quando comparada ao método laboratorial enzimático, apresenta um atraso de leitura de 10-15 minutos em situações que a glicemia oscila abruptamente, como ocorre quando é aplicado o teste combinado de glicose insulina. Os tempos (T60, T75, T90, T105, T120, T135 e T150 minutos) são semelhantes entre si para as técnicas de Freestyle Libre e enzimática laboratorial.

Tabela 4 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) de glicose (mg/dL), (FreeStyle Libre e enzimático) do teste combinado glicose insulina no grupo obesos.

Tempo (minutos)	MÉTODOS	
	Freestyle Libre	Laboratório Enzimático
0	103,00 ($\pm$ 29,44) ^F	94,83 ($\pm$ 32,11) ^F
1	113,16 ($\pm$ 34,68) ^C	215,83 ($\pm$ 33,02) ^A
5	153,66 ($\pm$ 48,00) ^C	165,16 ($\pm$ 47,00) ^B
15	190,16 ($\pm$ 59,77) ^A	123,66 ($\pm$ 31,02) ^C
25	158,16 ($\pm$ 59,22) ^C	94,33 ($\pm$ 25,71) ^F
35	105,50 ($\pm$ 26,99) ^D	78,00 ($\pm$ 29,94) ^H
45	82,50 ($\pm$ 23,89) ^H	71,16 ($\pm$ 33,28) ^H
60	61,00 ($\pm$ 23,66) ^H	58,50 ($\pm$ 24,32) ^H
75	59,83 ($\pm$ 16,83) ^H	64,50 ($\pm$ 32,21) ^H
90	55,50 ($\pm$ 10,78) ^H	63,83 ($\pm$ 25,70) ^H
105	59,33 ($\pm$ 14,23) ^H	71,33 ($\pm$ 11,79) ^H
120	69,33 ($\pm$ 16,45) ^H	71,00 ($\pm$ 10,48) ^H
135	77,00 ($\pm$ 24,81) ^H	82,33 ($\pm$ 17,96) ^H
150	77,00 ($\pm$ 25,81) ^H	78,66 ($\pm$ 12,06) ^H

*Na linha, médias com letras maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Pela análise da grade de erros, observou-se que no teste combinado de glicose e insulina nos animais obesos utilizando o FreeStyle Libre, 30,95% dos valores de glicemia apresentaram-se na zona A (Tabela 5) quando comparados ao método de referência e 55,95% dos valores apresentaram-se na zona C.

Tabela 5 – Resultado da análise grade de erros no grupo obeso submetido ao teste combinado e glicose e insulina.

Zona	Número de amostras	%
A	26	30,95%
B	4	4,76%
C	47	55,95%
D	7	8,33%
E	0	0,00%
A + B	30	35,71%

No Gráfico 7 observa-se que os valores distribuídos na zona A são valores de até 70 mg/dL, portanto, são valores indicativos de normoglicemia, enquanto que os valores hiperglicêmicos apresentaram-se nas zonas D e C. A zona C representa dados que levariam a uma sobrecorreção dos níveis normais de glicose, e a zona D representam dados que induziriam falha na detecção de eventos de hiperglicemia e/ou hipoglicemia, levando a erro clínico significativo.

Gráfico 7 – Avaliação pela análise da grade de erros do glicosímetro FreeStyle Libre em animais obesos submetidos ao teste combinado de glicose e insulina

No gráfico de dispersão (Gráfico 8) observa-se que a concordância é maior para valores de glicemia até 85 mg/dL. Os valores de hiperglicemia apresentam-se dentro dos limites, mas com pontos de menor concordância. Os pontos fora dos limites de concordância são valores do teste combinado de glicose e insulina, que estimula rápida elevação nos níveis de glicemia, e hipoglicemia acentuada após infusão de insulina regular. Essas oscilações rápidas de glicemia promovida pelo teste não permitem que o sistema de monitoração contínua da glicemia realize leituras precisas em tempo real, necessitando de aproximadamente 15 minutos para se igualar ao níveis sanguíneos.

Gráfico 8 - Gráfico de dispersão para a diferença e média entre os valores de glicemia no grupo obeso submetido ao teste combinado de tolerância de glicose e insulina, métodos (FreeStyle Libre) e enzimático (laboratorial) (as linhas verde e vermelha representam o limite superior e inferior de concordância; a linha pontilhada representa o valor médio do viés).

A aplicação do sensor não resultou em reações cutâneas nos 10 animais estudados. Após o ensaio clínico de comparação da glicemia e TCGI, os sensores foram mantidos para avaliação de fixação e duração de funcionamento. Apenas quatro animais ficaram com o sensor durante sete dias, que foi o prazo máximo estabelecido para acompanhamento, três animais retiraram o sensor após três dias de aplicado, dois animais retiraram no dia seguinte após o teste, um animal retirou no mesmo dia

após as coletas, e um animal retirou durante as coletas, sendo substituído por outro animal para completar os dados do grupo que representava.

6 DISCUSSÃO

A aplicação do sensor no pescoço dos cavalos foi rápida, simples, indolor e intuitiva por causa do aplicador fornecido dentro do pacote do dispositivo. Após a aplicação, o sensor tem período de 1 hora de inicialização e em todos os cavalos o sensor iniciou a leitura de glicose intersticial após 60 minutos da aplicação como relatado pelo fabricante.

Os sensores do sistema de monitoração contínua FreeStyle Libre foram inseridos no terço inicial do pescoço na face dorso lateral, conforme descrito por Johnson et al. (2011) utilizando o aparelho Medtronic Minimed®. Durante o período de coleta não foram observadas alterações de comportamento e reações cutâneas.

Após o período de coleta, os sensores não foram retirados dos animais, que permaneceram estabulados com o sensor para avaliação do tempo de funcionamento por um período de até sete dias. Entre os animais avaliados, três permaneceram sete dias com o sensor em funcionamento, três retiraram o sensor após a avaliação glicêmica, e quatro dobraram a sonda após três dias. Segundo Corradini et al. (2016), alguns animais apresentaram, após alguns dias, o dobramento do cateter, portanto, uma sonda maior que 5mm seria indicado para o uso do SMCG em animais. O FreeStyle Libre possui um cateter de 4 milímetros.

Os animais que retiraram o sensor precocemente eram animais naturalmente mais agitados e jovens, apresentando comportamento compatível com maior estresse. A condição da baia foi outro fator relevante, pois as coletas foram realizadas em diferentes propriedades e, portanto, a estrutura interna das baias permitia aos animais que retirassem os sensores. Cavalos que ficavam ociosos ou privados de feno de capim foram os animais que retiravam o sensor antes dos sete dias.

A diferença média entre os valores de glicemia para hígidos e obesos nos tempos (T0, T1, T2, T3, T4 e T5), não apresentaram diferença estatística entre os métodos, mostrando uma diferença média mínima de ($\pm 6,34$ mg/dL), portanto, a diferença média da glicemia intersticial comparado com o método referência foi mínimo para ambos os grupos em todos os tempos ao longo das 10 horas de monitoração, concordando com os dados de Hug et al. (2013) e Wiedmeyer et al. (2005), que utilizaram em potros e cavalos adultos o sistema Medtronic Minimed®.

O uso do FreeStyle Libre resultou na medição precisa de glicemia em cavalos hígdos e obesos em comparação com os valores do método de referência para glicose sanguínea. Os resultados demonstraram alta correlação ($r=0,84$) para ambos os grupos, corroborando os dados obtidos por Alvarez et al. (2017) e Corradini et al. (2016) na avaliação de cães hígdos e diabéticos utilizando o mesmo dispositivo.

Os resultados apresentados pela análise da grade erros dos grupos hígdos e obeso, demonstraram que 98,61% (precisão analítica), encontravam-se nas zonas clinicamente aceitáveis (A+B), corroborando os dados encontrados por Alvarez et al. (2017) e por Corradini et al. (2016), que utilizaram o mesmo dispositivo em cães hígdos e diabéticos. Assim, o SMCG testado demonstrou ser adequado para o uso clínico em equinos, tanto hígdos quanto obesos.

A concordância das análises entre os métodos de mensuração para glicemia nos grupos hígdos e obeso apresentaram 99,8% de concordância. Esses dados foram semelhantes aos relatados por Moretti et al. (2010) em gatos utilizando o dispositivo Guardian REAL-Time® e também para os dados de Hug et al. (2013) avaliando potros neonatos com o dispositivo Medtronic Minimed®, sendo que o valor de referência utilizado foi de 95%.

Na avaliação do grupo obeso submetido ao teste combinado de glicose e insulina (TCGI) para diagnóstico de resistência à insulina, os valores médios apresentaram diferença estatística entre as técnicas nos tempos (T1, T5, T15, T25 e T35), as diferenças apresentadas nos respectivos tempos, correspondem aos valores de glicemia que obtiveram oscilações abruptas inerentes à infusão de dextrose e insulina no TCGI. Portanto, a diferença entre os valores é decorrente do atraso de leitura, que nos tempos citados é justificado pela diferença da concentração de glicose no fluido intersticial, o que já era esperado. Vários estudos demonstraram que o equilíbrio de glicose através da barreira endotelial capilar não é instantâneo (FACCHINETTI et al., 2007) e, como consequência, as concentrações de glicose plasmática exibem padrões dinâmicos diferentes, particularmente durante mudanças rápidas, necessitando portanto de tempo para atingirem as mesmas concentrações nos compartimentos capilares e espaço subcutâneo (STEIL et al., 2003).

Os resultados encontrados nesse estudo foram semelhantes aos encontrados em estudos de diferentes espécies em condições de hipoglicemia e hiperglicemia em cães (CORRADINI et al., 2016), potros neonatos (HURG et al., 2013) e cães e gatos (SURMAN et al., 2013), onde a concordância entre os métodos ficou evidente quando

os dados do SMCG apresentaram um atraso de 15 minutos, sugerindo que 15 minutos sejam necessários para a detecção de mudanças dinâmicas na concentração de glicose no sangue. O atraso médio entre uma mudança na concentração de glicose no sangue comparada com a concentração de glicose intersticial nesse estudo foi de aproximadamente 12 minutos, concordando com estudos de outras espécies, que apresentaram tempo de atraso de aproximadamente 5, 10 e 11 minutos em humanos (BRIDGES et al., 2010), 10 em cães (CORRADINI et al., 2016) e 11 em gatos (SURMAN et al., 2013).

O teste combinado de glicose e insulina descrito por Eiler et al. (2005) foi aplicado juntamente com o SMCG nos animais com $ECC \geq 7$, com a finalidade de diagnóstico a campo de animais com resistência à insulina. Dentre os cinco animais avaliados, um foi diagnosticado com resistência à insulina por apresentar valores glicêmicos acima do basal no tempo (T45), sendo registrado nos dois métodos de avaliação glicêmica, e um animal demonstrou elevados valores de glicemia em jejum (T0) utilizando os métodos Freestyle Libre e laboratorial padrão, caracterizando desregulação de insulina, sendo os valores de referência utilizados de 80 a 110 mg/dL, segundo Bertin et al. (2017) e Frank (2011).

Apesar de ter sido diagnosticado apenas um animal com (RI) entre os cinco obesos utilizados para o estudo, o SMCG testado demonstrou que pode ser utilizado para avaliação glicêmica durante o TCGI e útil para o diagnóstico de (RI), pois observou-se alta correlação entre as técnicas para mensuração da glicemia nos tempos (T0) e (T45), com $r=0,90$ e $r=0,75$ respectivamente, que são os tempos utilizados para diagnóstico de resistência à insulina.

Os valores entre os tempos (T60, T75, T90, T105, T120, T135 e T150 minutos) apresentaram forte correlação entre as técnicas exceto o T90. A baixa correlação nesse tempo é devido a segunda infusão de dextrose nos animais que apresentaram hipoglicemia com sudorese intensa durante o TCGI. Dois animais apresentaram acentuada hipoglicemia sendo necessária uma segunda infusão de dextrose 50%, resultando em um segundo pico de glicemia e consequente tempo de atraso (± 12 minutos) na leitura.

A concordância entre os métodos de avaliação glicêmica foi melhor para os valores normoglicêmicos, pois observou-se uma relação maior entre viés e as médias para valores inferiores a 90 mg/dL. A concordância entre os valores acima do basal foram menores devido ao atraso de leitura do sensor, estimado em aproximadamente

12 minutos. A concordância entre os valores de hiperglicemias foram menores pois são resultantes de um teste de tolerância intravenoso. É provável que um teste oral apresente maior concordância entre os dados pois o pico glicêmico é mais lento chegando ao máximo em duas horas conforme apresentado por Trindade et al. (2017). Entretanto, essa discordância entre os valores acima do basal após infusão de dextrose não interferiu na correlação entre os tempos T0 e T45, que são utilizados para diagnóstico de RI.

Na avaliação pela grade de erros, apenas 35,71% dos valores apresentaram-se nas zonas (A+B), esses dados estão representados por valores normoglicêmicos. Os valores acima do basal apresentaram-se na zona D. Portanto, a avaliação do FreeStyle Libre em TCGI deve ser comparado com outros métodos de referência para intervenções clínicas agudas, pois os valores podem estar subestimados devido aos níveis glicêmicos no compartimento do subcutâneo não terem se igualado rapidamente aos níveis sanguíneos.

Os sensores do presente estudo não foram avaliados anteriormente em equinos, e a comparação com estudos semelhantes é difícil, devido às diferenças nos métodos. A grade de erros foi desenvolvida a partir de um consenso entre médicos especialistas em diabetes humana, que se basearam no fato de que os sensores devem ser precisos o suficiente para a monitoração do controle glicêmico (PARKES et al., 2000; CLARKE et al., 1987). Portanto, esse tipo de análise foi desenvolvido para aplicação em humanos, embora já tenha sido usado em medicina veterinária em outras espécies.

O uso de SMCG diminui a necessidade de manuseio do paciente durante o TCGI, pois a coleta de sangue para fins de calibração não é necessária. Segundo Johnson et al. (2011), protocolos diagnósticos que simplesmente avaliam respostas de glicose podem indicar resultados normais de glicemia intersticial no TCGI, portanto, animais com resistência à insulina não poderiam ser diagnosticados. Os dados obtidos nesse estudo discordam, pois os valores basais e 45 minutos após início do teste apresentaram forte correlação.

Atualmente, o TCGI para fins de demonstração de RI exige que a concentração sérica de insulina deve ser mensurada nos tempos 0 e 45 minutos após infusão de 150 mg/kg de dextrose e 0,10 UI/kg de insulina regular, consequentemente a detecção de concentrações mais elevadas de insulina durante o TCGI indicam aumento da compensação (presumivelmente RI). Embora o uso de SMCG diminua a necessidade

de amostragem e estresse da manipulação durante o TCGI, a dosagem de insulina não elimina completamente a necessidade de coleta de amostras.

A monitoração de glicose intersticial pode ser uma ferramenta útil e prática para neonatos hospitalizados em condições clínicas críticas conforme descrito por HUG et al. (2013). Assim, o aparelho testado pode ser uma excelente opção para tal, devendo-se apenas testar a fixação do sensor para tais animais.

Outra indicação de uso seria para animais com distúrbios gastrintestinais que necessitam de jejum prolongado, ou até mesmo para monitorar glicemia de animais que estão recebendo nutrição parenteral.

Outra perspectiva de estudo para o dispositivo Freestyle Libre® seria quanto ao ponto de fixação do sensor, com intuito de prolongar o tempo de uso do sensor em equinos.

A perspectiva de utilização e pesquisas futuras para a medicina veterinária também deve avançar na utilização de sistemas de circuito fechado, permitindo infusão direta de insulina com auxílio da bomba acoplada ao sensor de monitoração contínua, tornando-se extremamente útil em episódios de hiperglicemia identificados com o SMCG.

7 CONCLUSÕES

- O Sistema de monitoramento contínuo da glicose FreeStyle Libre pode ser utilizado para avaliação indireta da glicemia por meio da glicose intersticial em cavalos adultos hípidos e obesos.
- O sensor do sistema FreeStyle Libre pode permanecer por até sete dias em equinos, desde que bem protegido, sem interferência nas medições.
- O sistema FreeStyle Libre pode ser usado durante o teste combinado de glicose e insulina, pois demonstrou ser confiável para as leituras referentes aos tempos de diagnóstico da resistência à insulina em equinos
- Para a avaliação da curva glicêmica deve ser considerado o tempo fisiológico para equilíbrio das concentrações de glicose intersticial.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ, A., PLANELLAS, M., PASTOR, J., FONT J., CAIRÓ J. Valoración del uso del Sistema de monitorización Flash de glucosa en tiempo real (FGMS) en perros hospitalizados. **Clinica Veterinaria Pequeños Animales**. v.37, p.195 – 200, 2017.

ANTUNA-PUENTE, B., FEVE, B., FELLAHI, S. BASTARD, J.P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes Metabolic**. v.34, p.2-11, 2008.

ARGO, C.M., CURTIS, G.C., GROVE-WHITE, D., DUGDALE, A.H., BARFOOT, C.F. HARRIS, P.A. Weight loss resistance: a further consideration for the nutritional management of obese. **Equine Veterinary Journal**. v.194, p.179-188, 2012.

ASPLIN, K.E., SILLENCE, M.N., POLLITT, C.C. AND MCGOWAN, C.M. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. **Veterinary Journal**. v.174, p.530-535, 2007.

BAMFORD, N.J., BASKERVILLE, C.L., HARRIS, P.A. BAILEY, S.R. Postprandial glucose, insulin, and glucagon-like peptide-1 responses of different equine breeds adapted to meals containing micronized maize. **Journal Animal Science**. v.93, p.3377-3383, 2015.

BAMFORD, N.J., POTTER, S.J., BASKERVILLE, C.L., HARRIS, P.A. AND 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. **Veterinary Journal**. v.214, p.14-20, 2016.

BERGMEYER, H. V. **Methods of enzymatic analysis**. local: Academic Press, 2nd ed. 1975. p. 1205-1214.

BERTIN, F.R. AND SOJKA-KRITCHEVSKY, J.E. Comparison of a 2-step insulin-response test to conventional insulin-sensitivity testing in horses. **Domestic Animal Endocrinology**. v.44, p.19-25, 2013.

BLAND, J.M., ALTMAN, D.G. **Statistical Methods in Medical Research**. v.8, p.135–160, 1999.

BORER-WEIR, K.E., MENZIES-GOW, N.J., BAILEY, S.R., HARRIS, P.A. AND ELLIOTT, J. Seasonal and annual influence on insulin and cortisol results from overnight dexamethasone suppression tests in normal ponies and ponies predisposed to laminitis. **Equine Veterinary Journal**. v.45, p.688-693, 2013.

BRIDGES B.C, PREISSIG C.M, MAHER K.O. Continuous glucose monitors prove highly accurate in critically ill children. **Critical Care**. v.14, p.176, 2010.

BURGE, M, MITCHELL, S, SAWYER, A. Continuous glucose monitoring: the future of diabetes management. **Diabetes Spectrum**. v.21, p.112–119, 2008.

BURNS, T.A., GEOR, R.J., MUDGE, M.C., MCCUTCHEON, L.J., HINCHCLIFF, K.W. AND BELKNAP, J.K. Proinflammatory cytokine and chemokine gene expression profiles in subcutaneous and visceral adipose tissue depots of insulin-resistant and insulin-sensitive light breed horses. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v.24, p.932-939, 2010.

CALTABILOTA, T.J., EARL, L.R., THOMPSON, D.L. JR, CLAVIER, S.E. AND MITCHAM, P.B. Hyperleptinemia in mares and geldings: assessment of insulin sensitivity from glucose responses to insulin injection. **Journal Animal Science**. v.88, p.2940-2949, 2010.

CARTER, R.A., GEOR, R.J., BURTON STANIAR, W., CUBITT, T.A. AND HARRIS, P.A. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. **Veterinary Journal**. v.179, p.204-210, 2009.

CARTER, R.A., MCCUTCHEON, L.J., VALLE, E., MEILAHN, E.N. GEOR, R.J. Effects of exercise training on adiposity, insulin sensitivity, and plasma hormone and lipid concentrations in overweight or obese, insulinresistant horses. **American Journal Veterinary Research**. v.71, p.314-321, 2010.

CHAMEROY, K.A., FRANK, N., ELLIOTT, S.B. BOSTON, R.C. Comparison of plasma active glucagon-like peptide 1 concentrations in normal horses and those with Equine Metabolic Syndrome and in horses placed on a high-grain diet. **Journal Equine Veterinary Science**. v.40, p.16-25, 2016.

CLARKE, S.F, FOSTER, J.R. A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. **British Journal of Biomedical Science**. v.69, p.83–93, 2012.

CLARKE, W.L, COX, D, GONDER-FREDERICK, L.A, CARTER, W, POHL S.L. Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose. **Diabetes Care**. v.10, p.622–628, 1987.

CORE, R.; TEAM R. A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>. 2017

CORRADINI, S.; PILOSIO DONDI, B. F.; LINARI, G.; TESTA, S.; BRUGNOLI, F.; GIANELLA PIETRA, P. M.; FRACASSI, F. Accuracy of a Flash Glucose Monitoring System in Diabetic Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.30, p.983–988, 2016

DATTA, D. Blandr: A Bland- Altman method comparasion package for R. Zenodo. Acessado em: Março 2018. Disponvel em:<https://github.com/deepankardatta/blandr>. 2017.

DAVEY, R.J, LOW, C, JONES T.W. Contribution of an intrinsic lag of continuous glucose monitoring systems to differences in measured and actual glucose concentrations changing at variable rates in vitro. **Journal Diabetes Science Technology**. v.4, p.1393–1399, 2010.

DE LAAT, M.A., HAMPSON, B.A., SILENCE, M.N., POLLITT, C.C. Sustained, low-intensity exercise achieved by a dynamic feeding system decreases body fat in ponies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.30, p.1732-1738, 2016.

DE LAAT, M.A., MCGREE, J.M. AND SILENCE, M.N. Equine hyperinsulinemia: investigation of the enteroinsular axis during insulin dysregulation. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v.310, p.61-72, 2016.

DE LAAT, M.A., PATTERSON-KANE, J.C., POLLITT, C.C., SILENCE, M.N. AND MCGOWAN, C.M. Histological and morphometric lesions in the preclinical, developmental phase of insulin-induced laminitis in Standardbred horses. **Veterinary Journal**. v.195, p.305-312, 2013.

DEXCOM. Seven continuous glucose monitoring system user's guide 2010. Disponível em: http://www.dexcom.com/sites/dexcom.com/files/seven/docs/SEVEN_System_Users_Guide.pdf.> Acessado: Novembro 17, 2012.

DUNBAR, L.K., MIELNICKI, K.A., DEMBEK, K.A., TORIBIO, R.E. AND BURNS, T.A. Evaluation of four diagnostic tests for insulin dysregulation in adult light-breed horses. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v.30, p.885-891, 2016.

EILER, H.; FRANK, N.; ANDREWS, F.M. Physiologic assessment of blood glucose homeostasis via combined intravenous glucose and insulin testing in horses. **American Journal of Veterinary Research**. v.66, p.1598– 1604, 2005.

FACCHINETTI, A. SPARACINO, G. COBELLI C. Reconstruction of glucose in plasma from interstitial fluid continuous glucose monitoring data: role of sensor calibration. **Journal of Diabetes Science and Technology**. v.5, p.617–623, 2003.

Food and Drug Administration (FAD). Center for Devices and Radiological Health Official Report #P050012B. 2017.

FRANK, N. AND TADROS, E.M. Insulin dysregulation. **Equine Veterinary Journal**. v.46, p.103-112, 2014.

FRANK, N., ELLIOTT, S.B., CHAMEROY, K.A., TOTH, F., CHUMBLER, N.S. AND MCCLAMROCH, R. Association of season and pasture grazing with blood hormone and metabolite concentrations in horses with presumed pituitary pars intermedia dysfunction. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v.24, p.1167- 1175, 2010.

GARCIA, M. C., J. BEECH. Equine intravenous glucose-tolerance test—Glucose and insulin responses of healthy horses fed grain or hay and of horses with pituitary-adenoma. **American Journal Veterinary Research**. v.47, p.570, 1986.

GEOR, R.J. AND HARRIS, P. Dietary management of obesity and insulin resistance: countering risk for laminitis. **Veterinary Clinics of North America.: Equine Practice**. v.25, p.51-65, 2009.

GHILONI, S., O'DONNELL, S. Making sense of sensors a primer on CGM. 2017. Disponível em: <https://www.joslin.org/docs/Primer_on_CGMhandout.pdf>. Acesso em: 17 de Novembro.2017.

GUNGOR, N., SAAD, R., JANOSKY, J. ARSLANIAN, S. (2004) Validation of surrogate estimates of insulin sensitivity and insulin secretion in children and adolescents. **Journal Pediatric**. v.144, p.47-55, 2004.

HART, K.A., WOCHLE, D.M., NORTON, N.A., MCFARLANE, D., WOOLDRIDGE, A.A. FRANK, N. Effect of age, season, body condition, and endocrine status on serum free cortisol fraction and insulin concentration in horses. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v.30, p.653-663, 2016.

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**, v. 15, n. 4, p. 371-372, 1983.

HOLZ, G.G.T., KUHTREIBER, W.M. HABENER, J.F. Pancreatic betacells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. **Nature**, v.361, p.362-365, 1993.

HUG, S. A.; RIOND, B.; SCHWARZWALD, C. C. Evaluation of a continuous glucose monitoring system compared with an in-house standard laboratory assay and a handheld point-of-care glucometer in critically ill neonatal foals. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. v.23, p 408–415, 2013.

JEFFCOTT, L. B., J. R. FIELD.. Current concepts of hyperlipemia in horses and ponies. **Veterinary Record**. v.116, p.461, 1985.

JOHNSON, P. J., S. H. Slight, V. K. Ganjam, 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 MESSER, A. N.T.; DINGFELDER COGSWELL, H. A. 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. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.25, p.162–165, 2011.

JOSE-CUNILLERAS, E., HINCHCLIFF, K.W., SAMS, R.A., DEVOR, S.T. LINDERMAN, J.K. Glycemic index of a meal fed before exercise alters substrate use and glucose flux in exercising horses. **Journal of Applied Physiology**. v.92, p.117-128, 2002.

KARIKOSKI, N.P., HORN, I., MCGOWAN, T.W. AND 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.

KEARNS, C.F., MCKEEVER, K.H., ROEGNER, V., BRADY, S.M. MALINOWSKI, K. Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. **Veterinary Journal**. v.172, p.460-465, 2006.

KEENAN D.B, MASTROTOTARO J.J, ZISSER, H. Accuracy of the Enlite 6-day glucose sensor with guardian and Veo calibration algorithms. **Diabetes Technology Therapy**. v.4, p.225–231, 2012.

KEENAN, D.B, MASTROTOTARO, J.J, VOSKANYAN, G. Delays in minimally invasive continuous glucose monitoring devices: a review of current technology. **Journal Diabetes Science Technology**. v.3, p.1207–1214, 2009.

KNOWLES, E.J., HARRIS, P.A., ELLIOTT, J. MENZIES-GOW, N.J. Use of the oral sugar test in ponies when performed with or without prior fasting. **Equine Veterinary Journal**. v.49, p.519-524, 2017.

KRONFELD, D.S., TREIBER, K.H. AND GEOR, R.J. Comparison of nonspecific indications and quantitative methods for the assessment of insulin resistance in horses and ponies. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.226, p.712-719, 2005.

LEWIS, S.L., HOLL, H.M., STREETER, C., POSBERGH, C., SCHANBACHER, B.J., PLACE, N.J., MALLICOTE, M.F., LONG, M.T. BROOKS, S.A. Genomewide association study reveals a risk locus for equine metabolic syndrome in the Arabian horse. **Journal Animal Science**. v.95, p.1071-1079, 2017.

MARTIN-GIMENEZ, T., DE BLAS, I., AGUILERA-TEJERO, E., DIEZ DE CASTRO, E. AND AGUIRRE-PASCASIO. Endocrine, morphometric, and ultrasonographic characterization of neck adiposity in Andalusian horses. **Domestic Animal Endocrinology**. v.56, p.57-62, 2016.

MCGOWAN, C.M., FROST, R., PFEIFFER, D.U. AND NEIGER, R. Serum insulin concentrations in horses with equine Cushing's syndrome: response to a cortisol inhibitor and prognostic value. **Equine Veterinary Journal**. v.36, p.295-298, 2004.

MCGOWAN, C.M.; FROST, R.; PFEIFFER, D.U. Serum insulin concentrations in horses with equine Cushing's syndrome: Response to a cortisol inhibitor and prognostic value. **Equine Veterinary Journal**. v.36, p. 295–298, 2004.

MENZIES-GOW, N.J., HARRIS, P.A. AND ELLIOTT, J. Prospective cohort study evaluating risk factors for the development of pasture-associated laminitis in the United Kingdom. **Equine Veterinary Journal**. v.49, p.300-306, 2016.

MESSER C. Continuous glucose monitoring: weighing the pros and cons. Disponible en: <https://www.verywell.com/continuous-glucose-monitoring-the-arrival-of-dexcom-5-3289566>, 2017.

MORETTI, S.; TSCHUOR, F.; OSTO, M. Evaluation of a novel real-time continuous glucose-monitoring system for use in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.24, p.120–126, 2010.

OLCZUK, D., PRIEFER, R. A history of continuous glucose monitors (CGMs) in self-monitoring of diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**. p.1-7, 2017.

PARK, S.E., PARK, C.Y. AND SWEENEY, G. Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance: past, present and future. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**. v.52, p.180-190, 2015.

PARKES J.L, SLATIN S.L, PARDO S. A new Consensus Error grid to evaluate the clinical significance of inaccuracies in the measurement of blood glucose. **Diabetes Care**. v.23, p.1143– 1148, 2000.

PICKUP, J.C.; FREEMAN, S.C.; SUTTON, A.J. Glycaemic control in type 1 diabetes during real-time continuous glucose monitoring compared with self-monitoring of blood glucose: Meta-analysis of randomised controlled trials using individual patient data. **British Medical Journal**. v.343, p.3805, 2011.

PRATT, S.E., GEOR, R.J. AND MCCUTCHEON, L.J. Repeatability of 2 methods for assessment of insulin sensitivity and glucose dynamics in horses. *Journal Veterinary Internal Medicine*. v.19, p.883-888. 2005. 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.

RALSTON, S.L. Hyperglycemia/hyperinsulinemia after feeding a meal of grain to young horses with osteochondritis dissecans (OCD) lesions. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**. v.12. p.320–322, 1996.

ROBERT T. FREDERICK, A. Introduction to diabetes mellitus. Disponível em: <<https://doi.org/10.14496/dia.1104519416.6>> 2014.

SCHMOLZE, D. Ega: Error Grid Analysis. R package version 2.0.0. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/ega/ega.pdf>. 2017.

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 Equine Veterinary Science**. v.34, p.465-470, 2014.

SINHA, M., MCKEON, K., PARKER, S. A comparison of time delay in three continuous glucose monitors for adolescents and adults. **Journal of Diabetes Science and Technology**. v1. P.1-6. 2017.

SLOUGH, T. L., C. D. GUNKEL, L. W. MURRAY, J. S. DROUILLARD. A comparison of methodologies for measuring glucose concentrations in the horse. **Professional Animal Scientist**. v.27, p.204–214, 2011.

SPARACINO G, ZANDERIGO F, CORAZZA S, MARAN A, FACCHINETTI A, COBELLI C. Glucose concentration can be predicted ahead in time from continuous glucose monitoring sensor time series. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**. v.54, p.931-937, 2007.

STEIL, G.M. REBRIN, K. MASTROTOTARO J.J., BERNABA B., SAAD. M.F. Determination of plasma glucose during rapid glucose excursions with a subcutaneous glucose sensor, **Diabetes Technology & Therapeutics**. v.5 p.27–31, 2003.

STEIL, G.M., REBRIN, K., HARIRI, F. Interstitial fluid glucosedynamicsduring insulin-induced hypoglycaemia. **Diabetologie**. v.48. p.1833–1840, 2005.

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

SURMAN, S.; FLEEMAN, L. Continuous glucose monitoring in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. n.43, p.381– 406, 2013.

SWIDORSKI D. Diabetes history. 2014. Disponível em: <<https://www.defeatdiabetes.org/diabetes-history/>>. Acesso em: 12 de fevereiro 2018.

THATCHER, C.D., PLEASANT, R.S., GEOR, R.J. AND ELVINGER, F. Prevalence of overconditioning in mature horses in southwest Virginia during the summer. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v.26, p.1413-1418, 2012.

TOTH, F., FRANK, N., ELLIOTT, S.B., PERDUE, K., GEOR, R.J. AND BOSTON, R.C. Optimisation of the frequently sampled intravenous glucose tolerance test to reduce urinary glucose spilling in horses. **Equine Veterinary Journal**. v.41, p.844-851, 2009.

TREIBER, K.H.; KRONFELD, D.S.; HESS, T.M. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.228, p.1538–1545, 2006

TRINDADE, K, L, G. OLIVEIRA, V.T.B.M., CAVALCANTI, M. E. O., SILVA, M. O., MANSO, H. E. C. C. C., FILHO, J. D. R. ABREU, J. M. G., MANSO FILHO, H. C. Teste oral com glicose de milho com e sem sódio produzem diferentes curvas de insulina e de glicose em equinos sadios. **Revista Acadêmica Ciência Animal**. v.15, p.27-33, 2017.

WAITT, L.H.; CEBRA, C.K. Characterization of hypertriglyceridemia and response to treatment with insulin in horses, ponies, and donkeys: 44 cases (1995–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.234, p.915–919, 2009.

WALLER, A.P., KOHLER, K., BURNS, T.A., MUDGE, M.C., BELKNAP, J.K. LACOMBE, V.A. Naturally occurring compensated insulin resistance selectively alters glucose transporters in visceral and subcutaneous adipose tissues without change in AS160 activation. **Biochim Biophys Acta**. v.1812, p.1098-1103, 2011.

WENTHOLT, I.M, HART, A.A, HOEKSTRA, J.B. Relationship between interstitial and blood glucose in type 1 diabetes patients: delay and the push-pull phenomenon revisited. **Diabetes Technology Therapy**. v.9, p.169–175, 2007.

WIEDMEYER C.E, JOHNSON P.J, COHN L.A. Evaluation of a continuous glucose monitoring system for use in veterinary medicine. **Diabetes Technology Therapy**. v.7, p.885–895, 2005.

WIEDMEYER, C.E.; JOHNSON, P.J.; COHN, L.A. Evaluation of a continuous glucose monitoring system for use in dogs, cats, and horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.223, p. 987–992, 2003.