

FABIO ALVES TEIXEIRA

**Respostas metabólicas de cães diabéticos alimentados com dietas  
contendo diferentes concentrações de ômega-3**

São Paulo

2020



FABIO ALVES TEIXEIRA

**Respostas metabólicas de cães diabéticos alimentados com dietas  
contendo diferentes concentrações de ômega-3**

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. Dr. Marcio Antonio Brunetto

São Paulo

2020

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

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3945  
FMVZ

Teixeira, Fabio Alves  
Respostas metabólicas de cães diabéticos alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de ômega-3 / Fabio Alves Teixeira. – 2020.  
104 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto.

1. Diabetes mellitus. 2. Canino. 3. Gordura. 4. Ácidos graxos poli-insaturados. 5. Hiperlipidemia. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Respostas metabólicas de cães diabéticos alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de ômega-3", protocolada sob o CEUA nº 7943060716, sob a responsabilidade de **Márcio Antônio Brunetto e equipe; Fabio Alves Teixeira** - 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 23/11/2016.

We certify that the proposal "Metabolic responses of diabetic dogs fed diets with different omega-3 concentrations", utilizing 10 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7943060716, under the responsibility of **Márcio Antônio Brunetto and team; Fabio Alves Teixeira** - 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 11/23/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **10/2019**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 16 anos**

N: **10**

Linhagem: **Todas as raças**

Peso: **2 a 70 kg**

Resumo: O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome crônica que resulta em hiperglicemia e hiperlipidemia como consequência da deficiência de insulina, que altera o metabolismo de carboidratos e gorduras com maior liberação de cetoácidos para o plasma, podendo gerar o quadro de cetoacidose diabética, o qual pode levar a morte. A administração de insulina e o manejo alimentar que minimize a resposta glicêmica e lipídica pós-prandial constituem a base do tratamento. Apesar de o metabolismo lipídico estar alterado na ausência de insulina são raros os estudos publicados que tenham avaliado a influência da quantidade e do tipo de gordura na dieta dos cães diabéticos. A importância de se controlar a hiperlipidemia canina está no fato de que as concentrações sanguíneas aumentadas de colesterol e triglicérides nesta espécie são relacionadas a outras condições como pancreatite, doenças hepatobiliares, resistência insulínica, oftalmopatias, convulsão, lipoma e até mesmo aterosclerose. As evidências dos efeitos hipolipidêmicos dos ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 (AGPI-3) são citadas em humanos, animais de laboratórios e em cães saudáveis, porém nunca foram avaliados em cães diabéticos, assim como não foi testado o possível efeito destes nutrientes como minimizadores da hiperglicemia de cães diabéticos. Assim, este estudo objetiva avaliar as respostas glicêmicas e lipídicas de cães com DM naturalmente adquirido após alimentação enriquecida com diferentes concentrações de ômega-3. Serão empregados 10 cães acometidos por DM, machos ou fêmeas, de faixas etárias variadas, sem outras afecções concomitantes, selecionados na rotina do HOVET/FMVZ/USP. Os animais serão alimentados a cada 12 semanas com uma das três dietas isonutrientes indicadas para cães diabéticos, que serão diferenciadas exclusivamente pela ausência de AGPI-3 (dieta Controle), por conter em torno da quantidade empírica mínima recomendada de AGPI-3 (dieta Teste 1) e por apresentar aproximadamente 50% a mais concentração de AGPI-3 da dieta Teste 1 (dieta Teste 2). Serão avaliados parâmetros clínicos, exames bioquímicos e curva glicêmica de 72 horas por um sistema de mensuração contínua de glicemia instalado no animal no início e fim do período de avaliação da dieta controle e das Testes. Testes estatísticos paramétricos e não paramétricos serão empregados para a comparação dos resultados.

Local do experimento: HOVET-FMVZ/USP

São Paulo, 24 de novembro de 2016



## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: TEIXEIRA, Fabio Alves

Título: **Respostas metabólicas de cães diabéticos alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de ômega-3**

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.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_





## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Citando os nomes das médicas-veterinárias Cristiana Ferreira Fonseca Pontieri, Juliana Toloí Jeremias, Raquel Silveira Pedreira e Daniela Machado Pedrosa, agradeço imensamente a empresa Premier pet por todo o auxílio logístico, financeiro e pessoal, sem os quais seria impossível a realização do estudo.

Ao meu orientador, Professor Marcio Antonio Brunetto pelo empenho, confiança e liberdade que me deu em opinar durante este estudo e em todas as atividades do grupo de pesquisa.

À equipe de alunos de iniciação científica, sem a qual seria impossível ter conduzido o projeto: Vinicius Vasques de Oliveira, Gabriel Siqueira dos Santos, Tatiane Neves Pooli e Fernanda Yamamoto Tavares.

Às alunas de graduação Milena Piragibe Cardoso, Yara Pinheiro Arakaki, Pâmela Bosche Vasconcerca e Ronald de Carvalho Neto, que indiretamente auxiliaram no estudo.

À Mariana Silva de Salles Pacheco, companheira de todas as horas, pelo apoio e paciência em todas as etapas do estudo. Ao Caio Nogueira Duarte, amigo 72, e Mariana Y. H. Porsani, importante amizade adquirida durante a pós-graduação, que sempre estiveram por perto, dispostos a ajudar.

À Mariana Ramos Queiroz, também amiga 72, que ajudou na execução das análises estatísticas.

Às médicas-veterinárias contratadas do Serviço de Clínica Médica do HOVET-FMVZ/USP: Bruna M. Pereira C. Silva e, na época, Andrea Cerqueira Ferreira, que ajudaram na indicação de pacientes no início dos estudos. E agradecimento especial a Denise Maria Nunes Simões e a Khadine Kazue Kanayama, que devido sua afeição pela endocrinologia e amizade, também ajudaram muito durante o desenvolvimento do projeto.

À equipe do Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/HOVET-FMVZ/USP: Claudia Regina Stricagnolo, Creide Donizete Costa, Edna Santana dos Santos, Maria Helena da Silva e Clara Satsuki Mori que sempre ajudaram na logística e realização dos exames laboratoriais.

À Profa. Dra. Carla Aparecida Batista Lorigados e às residentes do Serviço de Diagnóstico por Imagens do HOVET-FMVZ/USP: Letícia Martins Nascimento, Fernanda de Carlo Deusdado, Priscila Mieko Lima Kiyuna e Patricia Schneider Yogi, por toda ajuda na realização do estudo.

Ao servidor (“enfermeiro”) do Serviço de Clínica Médica do HOVET-FMVZ, Milton Gregório dos Santos, pela logística de materiais e na rotina de atendimentos.

À equipe do Laboratório de Lípidos (LIM-10) da Faculdade de Medicina da USP, em especial à Profa. Dra. Edna Regina Nakandakare, Sergio Catanozi, Valeria Sutti Nunes e Kelly Gomes Lehns por toda ajuda nas análises de lipoproteína.

Aos médicos-veterinários contratados, Mariana S. Francisco Talib, Marcelo Faustino, Ayne Murata Hayashi, Viviane Sanchez Galeazzi e a Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, que foram fundamentais nas questões cirúrgicas e ortopédicas dos pacientes, como as castrações das cadelas diabéticas.

À toda equipe da administração do HOVET-FMVZ, que direta ou indiretamente, ajudou nas questões administrativas e na resolução dos problemas burocráticos. Assim como toda equipe de professores e a secretária Adelaide Borges, do programa de Pós de Graduação em Clínica Veterinária da FMVZ/USP.

À sra. Joselita Maria da Silva, por todo o zelo na manutenção da organização e higiene do ambiente hospitalar e sala de coleta.

À Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas por ter cedido a sala onde ocorreu a maioria das coletas do estudo. Às Profas. Dras. Márcia de Oliveira Sampaio Gomes e Maria Claudia Araripe Sucupira, pelos conselhos, auxílios e apoio.

Aos membros do GENP, pelas risadas, discussões e apoio.

Por fim, e não menos importante, aos animais que participaram do estudo, aos seus proprietários e a aqueles que se dispuseram a participar, mas por qualquer contratempo não puderam.

Agradeço a todos e já me desculpo se esqueci alguém que de alguma forma tenha colaborado.

## RESUMO

TEIXEIRA, F.A. **Respostas metabólicas de cães diabéticos alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de ômega-3.** 2020. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Há evidências de que a suplementação dietética de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI-3) possa modificar o metabolismo lipídico e glicêmico de indivíduos diabéticos, aspecto não estudado em cães. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar as respostas glicêmicas e lipídicas de cães com diabetes mellitus após a ingestão de ômega-3. Os cães diabéticos adultos, machos ou fêmeas, sem outras afecções, foram selecionados na rotina do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Estes foram incluídos em dois períodos experimentais de 12 semanas cada, nos quais receberam as dietas isonutrientes indicadas para cães diabéticos, denominadas como controle (sem óleo de peixe) e alimento teste (5,0% de óleo de peixe). Os resultados encontrados nas variáveis da curva glicêmica convencional e por sistema de mensuração contínua; curva de trigliceridemia e colesterolemia; perfil plasmático de lipoproteínas e variáveis do esvaziamento da vesícula biliar foram comparados por meio dos testes de Wilcoxon ou T pareado e, valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Foi observado que a ingestão média de  $142,9 \pm 34,2$  mg/kg da soma de ácido eicosapentaenóico e docosaexaenóico resultou em menor colesterolemia média ( $p=0,01$ ); mínima ( $p=0,02$ ); máxima ( $p=0,01$ ); em jejum ( $p=0,03$ ); duas ( $p<0,01$ ), quatro ( $p=0,01$ ) e 10 horas pós-prandial ( $p=0,02$ ); menor oscilação na colesterolemia ao longo do dia ( $p=0,03$ ); nas concentrações das frações de colesterol em VLDL ( $p<0,01$ ) e nas lipoproteínas não-HDL ( $p=0,05$ ). Não foi observado efeito nas variáveis relacionadas ao esvaziamento da vesícula biliar e trigliceridemia ( $p>0,05$ ). Observou-se maior concentração intersticial de glicose média total ( $p=0,04$ ), média noturna ( $p=0,02$ ), máxima diurna ( $p=0,01$ ) e noturna ( $p<0,01$ ), maior tempo em hiperglicemia ( $p<0,01$ ), com menor tempo em hipoglicemia ( $p<0,01$ ). A suplementação de óleo de peixe resultou em efeitos positivos na hipercolesterolemia mas, piorou a glicemia de cães diabéticos.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Canino. Gordura. Ácidos graxos poli-insaturados. Hiperlipidemia.



## ABSTRACT

TEIXEIRA, F.A. **Metabolic responses of diabetic dogs fed diets with different omega-3 concentrations**. 2020. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

There is evidence that dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA-3) can modify the lipid and glycemic metabolism of diabetic subjects, an aspect not studied in dogs. Thus, this study aimed to evaluate the glycemic and lipid responses of dogs with diabetes mellitus after omega-3 intake. Adult diabetic dogs, male or female, without other conditions, were selected in the routine of the Veterinary Hospital of School of Veterinary Medicine and Animals Science of University of São Paulo. These were included in two experimental periods of 12 weeks each, in which they received the isonutrient diets indicated for diabetic dogs, named as control (without fish oil) and test food (5.0% fish oil). The results found in the variables of the conventional glycemic curve and by continuous measurement system; triglyceridemia and cholesterolemia curve; plasma lipoprotein profile and gallbladder emptying variables were compared using Wilcoxon or paired T tests, and p values  $\leq 0.05$  were considered significant. It was observed that the average intake of  $142.9 \pm 34.2$  mg of the sum of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid/kg resulted in lower cholesterolemia variables: mean ( $p=0.01$ ); minimal ( $p=0.02$ ); maximum ( $p=0.01$ ); fasting ( $p = 0.03$ ); two ( $p<0.01$ ), four ( $p=0.01$ ) and 10 hours postprandial ( $p=0.02$ ); lower fluctuation throughout the day ( $p=0.03$ ); and lower cholesterol concentration in VLDL fraction ( $p<0.01$ ) and in non-HDL lipoproteins ( $p=0.05$ ). There was no effect on variables related to gallbladder emptying and triglyceridemia ( $p>0.05$ ). There was a higher interstitial concentration of total mean glucose ( $p=0.04$ ), nocturnal average ( $p=0.02$ ), maximum daytime ( $p=0.01$ ) and nighttime ( $p<0.01$ ), longer time in hyperglycemia ( $p<0.01$ ), with less time in hypoglycemia ( $p<0.01$ ). Fish oil supplementation resulted in positive effects on hypercholesterolemia, but it worsened the blood glucose levels of diabetic dogs.

Keywords: Diabetes mellitus. Canine. Fat. Polyunsaturated fatty acids. Hyperlipidemia.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1	Metabolismo lipídico .....	19
2.2	Diabetes mellitus e hiperlipidemia .....	24
2.3	Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.....	27
3	HIPÓTESE .....	33
4	OBJETIVOS .....	35
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1	Animais.....	37
5.2	Dietas experimentais .....	37
5.3	Estabilização do diabetes mellitus.....	40
5.4	Protocolo experimental.....	41
5.5	Curvas de trigliceridemia, colesterolemia e glicemia .....	43
5.6	Análises laboratoriais .....	44
5.7	Caracterização de lipoproteínas plasmáticas .....	44
5.8	Curva glicêmica por mensuração contínua.....	45
5.9	Esvaziamento da vesícula biliar .....	48
5.10	Análises estatísticas .....	49
6	RESULTADOS.....	50
6.1	Animais.....	50
6.2	Ingestão de nutrientes .....	52
6.3	Variáveis lipídicas.....	55
6.3.1	Curva de trigliceridemia e colesterolemia .....	55
6.3.2	Lipoproteínas .....	62
6.4	Esvaziamento da vesícula biliar .....	69
6.5	Avaliação glicêmica.....	72
6.5.1	Variáveis glicêmicas contínuas.....	72
6.5.2	Variáveis glicêmicas convencionais.....	76
6.5.3	Uso do sensor de mensuração contínua de glicemia .....	79
6.6	Particularidades e limitações do estudo .....	80
7	CONCLUSÕES .....	85
	REFERÊNCIAS.....	87





## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica, de etiologia multifatorial, que resulta em hiperglicemia como consequência da deficiência de insulina, que por sua vez pode levar a diversas complicações como perda de peso, perda súbita da visão por catarata, cetoacidose diabética, coma e morte. O principal objetivo do tratamento é manter a glicemia em valores próximos aos considerados normais, sem risco de hipoglicemia e, evitar grandes oscilações ao longo do dia (NELSON, 1989, 2010; NELSON; LEWIS, 1990; BRIIGS, 2000; ZICKER et al., 2010; AFFENZELLER; THALHAMMER; WILLMANN, 2011; FASCETTI; DELANEY, 2012).

Além das alterações glicêmicas, em estudos clínicos com cães diabéticos foi relatado o aumento na concentração sanguínea de triglicerídeos e colesterol (NELSON et al., 1998; GRAHAM et al., 2002; FLEEMAN; RAND; MARKWELL, 2009; TEIXEIRA et al., 2020). Isso se deve ao fato de que a principal forma de hiperlipidemia em cães é a secundária, principalmente resultante de endocrinopatias como o DM (BRADA; TOBISKA, 1967; WILSON et al., 1986; BARRIE et al., 1993; XENOULIS; STEINER, 2015).

A importância de se controlar a hiperlipidemia em cães diabéticos está no fato de que as concentrações sanguíneas aumentadas de colesterol e triglicerídeos, nesta espécie, estão relacionadas a outras situações de importância clínica e com potencial risco à vida dos cães, como pancreatite (COOK et al., 1993; HESS et al., 1998; XENOULIS et al., 2011a, 2020), hepatopatias (XENOULIS et al., 2008), mucocele da vesícula biliar e colelitíases (KUTSUNAI et al., 2014; LEE; KWEON; KIM, 2017), lipoma (XENOULIS; STEINER, 2015), resistência insulínica (XENOULIS et al., 2011b), aterosclerose (MAHLEY et al., 1977; LIU et al., 1986; KAGAWA et al., 1998; SOTTIAUX, 1999; HESS; KASS; VAN WINKLE, 2003), proteinúria (FURROW et al., 2016; SMITH et al., 2017), doenças oculares (CRISPIN, 1993) e neurológicas (BODKIN, 1992; FORD, 1993). Além disso, as concentrações sanguíneas aumentadas de lipídios podem interferir em outros exames como mensuração da concentração sérica de bilirrubinas, eletrólitos, proteínas, albumina e glicose; e atividade sérica de enzimas hepáticas, amilase e lipase (XENOULIS; STEINER, 2010).

Apesar do metabolismo lipídico estar alterado na deficiência de insulina a ponto de resultar em hiperlipidemia (BRADA; TOBISKA, 1967; WILSON et al., 1986;

BARRIE et al., 1993), poucos estudos avaliaram a influência da dieta no tratamento de cães diabéticos. As primeiras pesquisas publicadas investigaram os efeitos da quantidade ou tipo de fibra (BLAXTER; CRIPPS; GRUFFYDD-JONES, 1990; GRAHAM; MASKELL; NASH, 1994; NELSON et al., 1998; KIMMEL et al., 2000; GRAHAM et al., 2002; FLEEMAN; RAND; MARKWELL, 2009), seguidos pela suplementação de cromo (SPEARS; BROWN, 1998; SCHACHTER; NELSON; KIRK, 2001; MUZÍK et al., 2011) e tipo de amido (TESHIMA, 2010; TEIXEIRA et al., 2018) no controle glicêmico destes animais. Em alguns destes estudos, foram observados apenas achados referentes ao controle da hiperlipidemia após maior ingestão de fibra (NELSON et al., 1998; GRAHAM et al., 2002). O aumento da ingestão de fibra tem como princípio diminuir a absorção entérica de colesterol proveniente da alimentação e a absorção dos ácidos biliares provenientes da bile. Isso aumenta a excreção fecal de ambos e estimula a síntese hepática de ácidos biliares, que é dependente do uso do colesterol como substrato (FORD; LUDLOW, 2010; FASCETTI; DELANEY, 2012). O efeito das fibras na diminuição da trigliceridemia pode estar associado ao fato de que o aumento do conteúdo de fibra na dieta de cães influencia na digestibilidade de diversos nutrientes. Ao diminuir a digestibilidade da gordura pode haver menor absorção deste nutriente e, conseqüentemente, menor efeito da dieta na trigliceridemia. Entretanto, diversos estudos apontaram que o aumento da inclusão de fibra na dieta de cães apresentou pouco ou nenhum efeito na digestibilidade da gordura (MUIR et al., 1996; SILVIO et al., 2000; KIENZLE; DOBENECKER; EBER, 2001; GUEVARA et al., 2008; PANASEVICH et al., 2013).

No único estudo encontrado com foco na relação dos teores de gordura dietética com a lipidemia de cães com DM os autores concluíram que alimentos com menor concentração de extrato etéreo diminuiram a colesterolemia, ácidos graxos livres e glicerol; e tendência a menor trigliceridemia (FLEEMAN; RAND; MARKWELL, 2009). Entretanto, dietas de baixa gordura podem não ser suficientes para o controle da lipidemia (BAUER, 2011) ou mesmo não recomendada a todos os pacientes, já que há evidências de que alguns animais alimentados com alta fibra e baixa gordura recusam o alimento, perdem peso, apresentam ganho de peso deficiente, defecam fezes volumosas e amolecidas, podem apresentar flatulência, constipação, vômito e pelos opacos, por menor disponibilidade intestinal de outros nutrientes (NELSON et al., 1991, 1998; KIMMEL et al., 2000; HOENIG et al., 2001; GRAHAM et al., 2002; FLEEMAN; RAND; MARKWELL, 2009; ZICKER et al., 2010).

Em estudo prévio foi observado que o aumento na ingestão de gordura não alterou as concentrações séricas de triglicérides e de colesterol quando os cães receberam alimento com amido de digestão lenta. Entretanto, a colesterolemia e trigliceridemia aumentaram quando os animais receberam um alimento com a mesma quantidade de gordura, mas a base de milho em comparação ao alimento em que a fonte era ervilha e cevada (TEIXEIRA et al., 2020), o que ressalta a teoria de que diferentes ingredientes podem alterar o metabolismo lipídico de cães diabéticos.

Como alternativa de tratamento da hiperlipidemia, há a recomendação de suplementar a dieta de cães (XENOULIS; STEINER, 2015) e humanos (FRANZ et al., 2003) com ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 (AGPI-3), principalmente eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Para humanos, além do uso terapêutico à hiperlipidemia, a suplementação dos AGPI-3 pode ter efeito benéfico no controle glicêmico (FRIEDBERG et al., 1998; OOSTING et al., 2010; ZHENG et al., 2016), sem evidências na medicina veterinária e, para animais de laboratório pode haver efeito sobre a fluidez da bile e conseqüentemente no esvaziamento da vesícula biliar, também sem evidências para cães endocrinopatas.

Apesar de indícios de que a inclusão dietética de AGPI-3 parece resultar em modificações em todo o metabolismo lipídico, para pacientes diabéticos humanos estas evidências ainda são controversas (FRIEDBERG et al., 1998; HAMDY; BARAKATUN-NISAK, 2016) e para cães diabéticos isso não foi investigado.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 METABOLISMO LIPÍDICO

O metabolismo dos ácidos graxos, para fins didáticos, pode ser subdividido em vias metabólicas endógenas – as quais envolvem a metabolização dos lipídios produzidos no próprio organismo animal – e as exógenas. Estas, por sua vez, compreendem as reações relacionadas aos lipídios oriundos da dieta (XENOULIS; STEINER, 2010). Os triglicerídeos correspondem a maior parte da gordura dietética, associados ao colesterol, fosfolipídios e vitaminas lipossolúveis. A digestão lipídica inicia-se no estômago com a ação das lipases lingual e gástrica, mas ocorre em grande magnitude no intestino delgado a partir da presença das enzimas lipase pancreática, colesterol-ester hidrolase e a fosfolipase A2. Apesar da digestão lipídica ser mais simples, devido à necessidade de hidrólise de poucas ligações químicas e, portanto, menor necessidade de enzimas em comparação aos outros macronutrientes (BEITZ, 2015), a complexidade da digestão e absorção está na característica de lipossolubilidade das gorduras, que por isso depende da emulsificação pelos sais biliares, seguida pela hidrólise enzimática que gerará os ácidos graxos e monogliceróis, os quais serão solubilizados em micelas, para então serem absorvidos, reesterificados e agrupados em moléculas transportadoras que carrearão as gorduras pelo sistema linfático até o sangue (WASHBAU, 2013).

Dentre os diversos grupos de lipídios orgânicos, os mais importantes no contexto clínico são os ácidos graxos, esteróis, acilgliceróis e fosfolipídios. Eles possuem as funções de transferência de energia entre os órgãos, além de funções como cofator enzimático, síntese hormonal, constituintes de membrana celular e mensageiros intracelulares (XENOULIS; STEINER, 2010; CATANOZI, 2015).

O colesterol é o principal esteroide no tecido animal e sua reposição orgânica se dá principalmente pela síntese endógena e, pequena fração oriunda da dieta (WATSON; BARRIE, 1993). Dentre suas funções, as moléculas de colesterol atuam como substrato à síntese de outros compostos como vitamina D, ácidos biliares, bainha de mielina e hormônios esteróides (WATSON; BARRIE, 1993; XENOULIS; STEINER, 2010).

Já os triglicerídeos ou triacilgliceróis, principal membro do grupo dos acilgliceróis, são a forma de reserva energética mais importante nos mamíferos. Assim

como o colesterol, os triglicerídeos possuem como fontes a dieta e a síntese endógena. A síntese endógena deste lipídio pode acontecer no fígado, tecido adiposo, glândula mamária e na mucosa intestinal (XENOULIS; STEINER, 2010; HERDT; SAYEGH, 2014; BEITZ, 2015). Os triglicerídeos são a junção, por ligações éster, de três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol (HERDT; SAYEGH, 2014).

Os ácidos graxos são moléculas relativamente simples, em geral são componentes importantes de outros lipídios e são considerados a principal fonte de energia para a maioria dos tecidos (XENOULIS; STEINER, 2010). Mediante a ação da lipase hormônio sensível, há a liberação dos ácidos graxos presentes nos triglicerídeos estocados no tecido adiposo. Estes ácidos graxos, ao alcançarem outros tecidos como músculo esquelético e cardíaco, podem ser utilizados como substratos energéticos. Além disso, grande parte dos ácidos graxos é captada pelo fígado que, não só os utiliza como fonte energética, mas também para síntese de corpos cetônicos e da lipoproteína VLDL (*very low density lipoprotein*). Quando estão sob a forma livre, antes de serem utilizados para síntese de VLDL, o transporte dos ácidos graxos pelo sangue é realizado por meio da sua ligação reversível à albumina, quando passam a ser chamados de ácidos graxos não esterificados (HERDT; SAYEGH, 2014; BEITZ, 2015).

A forma de transporte das gorduras pelo organismo é importante, pois a principal característica em comum dos lipídios é sua hidrofobia. Desta forma, para serem distribuídos entre os tecidos pelos sistemas sanguíneo e linfático, ou seja, transportados em meio aquoso, os lipídios são agrupados em macroagregados moleculares esféricos chamados de lipoproteínas, que são macromoléculas anfipáticas, ou seja, apresentam na sua constituição uma camada interna lipofílica e externa hidrofílica (HERDT; SAYEGH, 2014). Assim, são formadas internamente por um núcleo de característica lipofílica, no qual estarão concentrados os triglicerídeos e o colesterol esterificado; e externamente por componentes proteicos solúveis em água (apolipoproteínas), fosfolipídios e colesterol livre. A superfície das lipoproteínas ainda possui carga elétrica negativa, o que impede sua agregação e a possível embolia gordurosa (BEITZ, 2015; CATANOZI, 2015).

As apolipoproteínas são fundamentais para a estrutura e metabolismo das lipoproteínas e são divididas em quatro famílias principais, denominadas apolipoproteína (apo) A, B, C e E, com subfamílias designadas por números ou subscritos. Essas proteínas são responsáveis por realizar a identificação e ligação das

lipoproteínas aos receptores da superfície celular, de modo que as lipoproteínas possam ser removidas da circulação. As apolipoproteínas também são responsáveis por ativar enzimas que atuam na metabolização lipídica (WATSON; BARRIE, 1993).

Existem diferentes classes de lipoproteína que são estabelecidas pela sua densidade, a qual é determinada pela proporção de lipídios (baixa densidade) e proteínas (alta densidade) presentes nas lipoproteínas (BEITZ, 2015). Em cães, ainda não há definição de qual seria a melhor classificação das lipoproteínas, pois não são conhecidas todas as características funcionais e a composição das subfrações, mesmo baseadas em suas densidades (XENOULIS et al., 2020). Classicamente, as principais lipoproteínas em cães são o quilomícron [densidade (d) menor que 0,95g/mL], a VLDL [*very-low-density lipoprotein* ( $d < 1,006\text{g/mL}$ )]; LDL [*low-density lipoprotein* ( $d < 1,019\text{g/mL}$ )] e HDL [*high-density lipoprotein* ( $d = 1,063$  a  $1,125\text{g/mL}$ )] (XENOULIS; STEINER, 2010; CATANOZI, 2015).

Os quilomícrons – as maiores lipoproteínas – são sintetizados no retículo endoplasmático liso das células epiteliais do intestino delgado e têm como função carrear os lipídios oriundos da dieta e da bile, pelo sistema linfático até a circulação sanguínea sistêmica, no ducto torácico (XENOULIS; STEINER, 2010; BEITZ, 2015; CATANOZI, 2015). Por ter seu núcleo central formado principalmente por triglicerídeos e menor número de moléculas de colesterol, esta lipoproteína apresenta alta concentração de triglicerídeos (BEITZ, 2015).

No sangue, por meio das apolipoproteínas, que funcionarão como marcadores, o quilomícron interage com enzimas em seu trajeto até o fígado. A lipoproteína-lipase, localizada na membrana basal das células endoteliais dos capilares de alguns tecidos, principalmente adiposo e muscular (cardíaco e esquelético), hidrolisa os triglicerídeos em mono-, di-glicerol, glicerol e ácidos graxos livres que serão convertidos em energia, quando no músculo e, em novos triglicerídeos, como forma de reserva energética, no tecido adiposo (XENOULIS; STEINER, 2010; CATANOZI, 2015). O quilomícron remanescente, agora com alta concentração de colesterol, ao alcançar o fígado será utilizado como fonte de colesterol para síntese de ácidos biliares, VLDL ou estoque de colesterol esterificado (XENOULIS; STEINER, 2010; CATANOZI, 2015).

A lipoproteína VLDL é sintetizada no fígado e tem como função transportar colesterol e triglicerídeos endógenos para os tecidos. Quanto maior for a captação hepática de lipoproteínas remanescentes com triglicerídeos e ácidos graxos oriundos da lipólise, maior será o estímulo para a síntese de VLDL (CATANOZI, 2015). A

importância da VLDL está no fato de haver um limite no transporte de ácidos graxos oriundos da lipólise do tecido adiposo pela albumina, ou seja, a VLDL passa a ser uma maneira mais eficiente de conseguir transportar a gordura nos momentos em que o tecido adiposo é o responsável por fornecer energia a outros tecidos, por exemplo em jejum (HERDT; SAYEGH, 2014).

Esta lipoproteína, semelhante ao quilomícron, interage com a enzima lipoproteína-lipase fornecendo triglicerídeos aos tecidos. Isso aumenta a densidade da VLDL e causa a perda de algumas apolipoproteínas, o que gera a VLDL remanescente, também chamada de IDL (*intermediary-density lipoprotein*), que apresenta alta concentração de colesterol (CATANOZI, 2015). A IDL, ao alcançar o fígado, pode sofrer catabolismo ou ter parte de seu conteúdo de triglicerídeos e fosfolipídios metabolizado pela lipoproteína-lipase hepática, o que aumenta a concentração relativa de colesterol no interior da lipoproteína, consequentemente aumenta a sua densidade e converte a IDL em LDL (XENOULIS; STEINER, 2010; CATANOZI, 2015). Em cães, acredita-se que não haja a lipoproteína IDL, ou seja, nesta espécie ocorre a transformação direta de VLDL remanescente em LDL (XENOULIS; STEINER, 2010; CATANOZI, 2015).

Por sua vez, a LDL, que possui elevado conteúdo de colesterol e fosfolipídios, alcança tecidos específicos nos quais liberará o colesterol para ser usado como componente da membrana celular ou substrato para síntese hormonal (XENOULIS; STEINER, 2010; CATANOZI, 2015). A problemática quanto a LDL, que a categoriza como “o mau colesterol”, está no fato desta lipoproteína estar associada ao desenvolvimento de placas de aterosclerose (BEITZ, 2015). Enquanto a lipoproteína HDL, que realiza o transporte reverso do colesterol dos tecidos para o fígado é chamado de “bom colesterol”, por auxiliar na minimização da possibilidade de deposição de colesterol na parede das artérias (RADER et al., 2009).

Assim, a HDL é a lipoproteína sintetizada no fígado que, dentre suas diversas funções, realiza a captação de colesterol de tecidos periféricos, inclusive de macrófagos da parede arterial e, o transporta de volta ao fígado, uma vez que poucos tecidos realizam a metabolização do colesterol (BAUER, 1996; RADER et al., 2009). A HDL ainda possui a função de transferência de apolipoproteínas, por exemplo a Apo-CII, para outras lipoproteínas como o quilomícron, o que permite a metabolização desta macromolécula pela lipoproteína-lipase (BAUER, 1996).



O padrão de quilomícrons e VLDL parece ser semelhante entre as espécies, cujas diferenças são baseadas principalmente no predomínio de LDL ou HDL como as principais lipoproteínas carreadoras de colesterol (JOHN CHAPMAN, 1986; WATSON, 1996). Essa distinção de perfil lipoproteico fez com que as espécies fossem separadas entre “animais HDL” e “animais LDL”. Na tentativa de associar o padrão dietético nessa classificação de perfil de lipoproteínas, os herbívoros (coelho, vaca, cabra e ovelha), junto dos carnívoros (leão, cão e alguns pinípedes), foram considerados como “espécies HDL”, devido a menor concentração de lipoproteínas LDL e, apenas algumas espécies, como os humanos, foram agrupadas como “animais LDL” (JOHN CHAPMAN, 1986). Entretanto, com o tempo passou-se a ser mais específico nessa denominação, pois alguns animais pareciam responder mais que outros às mudanças dietéticas que estimulariam o aumento na concentração de LDL. Assim, os humanos, coelhos, hamsters, cobaias, suínos, camelos, rinocerontes e a maioria dos macacos foram classificados como “espécies LDL”; enquanto cães, gatos, cavalos, ruminantes, ratos, camundongos e alguns primatas foram agrupados como “espécies HDL” (BAUER, 1996; WATSON, 1996).

Além desta separação clássica, as subclasses de lipoproteínas ainda podem gerar outras categorizações, mais relacionadas com as diferenças metabólicas entre as espécies (BAUER, 1996; XENOULIS et al., 2020). A lipoproteína HDL ainda pode ser subdividida em HDL<sub>1</sub> – presente em cães, ratos e suínos e, ausentes em humanos adultos (GLEESON et al., 1990), HDL<sub>2</sub> e HDL<sub>3</sub>. A diferença entre elas está na sua concentração de colesterol captado nos tecidos periféricos. Em cães, a baixa atividade da enzima CETP (*cholesterol-ester-transfer-protein*), a qual realiza a transferência de colesterol da HDL para as lipoproteínas LDL e VLDL, permite a maior captação de colesterol na molécula de HDL, gerando a HDL<sub>1</sub>, o que parece ser uma das justificativas para a menor incidência de aterosclerose em cães em comparação a humanos (XENOULIS; STEINER, 2010), além de outras alterações metabólicas relacionadas à transferência de colesterol da VLDL para HDL, intensificando o transporte reverso do colesterol dos tecidos adjacentes para o fígado, o que conseqüentemente aumenta a excreção deste lipídio via bile para as fezes (BAILHACHE et al., 2004; RADER et al., 2009).

## 2.2 DIABETES MELLITUS E HIPERLIPIDEMIA

O termo hiperlipidemia se refere ao aumento na concentração sanguínea de lipídios (triglicerídeos e/ou colesterol). Dentre as nomenclaturas, quando o aumento da concentração sanguínea ocorre especificamente pelos triglicerídeos dá-se o nome de hipertrigliceridemia, enquanto pelo colesterol, hipercolesterolemia. Já o termo lipemia deve ser empregado quando o plasma ou soro do animal apresentar nítida aparência láctea a olho nu. Dislipidemia, por sua vez, é a nomenclatura genérica utilizada quando há qualquer alteração no perfil lipídico do paciente (XENOULIS; STEINER, 2015).

A hiperlipemia possui diversas causas. Inicialmente deve-se considerar a possibilidade de hiperlipidemia pós-prandial, aquela caracterizada pelo aumento da concentração dos lipídios sanguíneos que será resolvida dentre sete a 12 horas após a finalização da refeição (XENOULIS; STEINER, 2015). Este período de avaliação pós-prandial é questionado, uma vez que estudos mostraram que apenas 12 horas em jejum podem não ser suficientes para diminuição máxima da concentração lipídica sanguínea (ELLIOTT et al., 2011, 2012), além da ausência de publicações que tenham avaliado quais são os valores de referência de aumento da lipidemia pós-prandial a ponto de considerar o animal saudável neste quesito.

Quando é descartada a situação pós-prandial, as possibilidades de justificativa para o aumento nas concentrações lipídicas classificam a hiperlipidemia em primária ou secundária. A secundária, que é a mais comum entre os cães, pode estar associada à administração de medicamentos como fenobarbital (KLUGER et al., 2008) e a diversas doenças como obesidade (CHIKAMUNE et al., 1995; BAILHACHE et al., 2003; JEUSETTE et al., 2005; MORI et al., 2011), nefropatia com perda proteica (DIBARTOLA et al., 1989; LITTMAN et al., 2000; KLOSTERMAN; PRESSLER, 2011), colestase (DANIELSSON et al., 1977), linfoma (OGILVIE et al., 1994), leishmaniose (NIETO et al., 1992), parvovirose (YILMAZ; SENTURK, 2007), hipernatremia (HANSELMAN et al., 2006) e, às endocrinopatias como hiperadrenocorticismismo, hipotireoidismo e DM (BRADA; TOBISKA, 1967; WILSON et al., 1986; GLEESON et al., 1990; BARRIE et al., 1993; BEHREND, 2015; NELSON, 2015; SCOTT-MONCRIEFF, 2015). Dentre estas causas de hiperlipidemia secundária, as mais comuns são as secundárias à endocrinopatias (XENOULIS; STEINER, 2015).

Os hormônios apresentam efeito direto na lipólise dos triglicerídeos e liberação dos ácidos graxos livres do tecido adiposo para o plasma. A noradrenalina, adrenalina e hormônios adrenocorticotrópicos estimulam a enzima lipase hormônio sensível, o que gera os diglicerídeos e ácidos graxos livres (BEITZ, 2015). Especificamente em relação aos diabéticos, sabe-se que a insulina desempenha importante papel no metabolismo lipídico. Ela é responsável pela lipogênese nas situações pós-prandiais por meio da estimulação de enzimas relacionadas ao anabolismo, ou seja, a reserva de nutrientes, ao mesmo tempo que inibe as enzimas de degradação (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

A lipoproteína-lipase está localizada nas superfícies endoteliais dos capilares e quando ativada catalisa a hidrólise de ácidos graxos presentes no núcleo de triglicerídeos dos quilomícrons e VLDLs, o que causa a transferência desses ácidos graxos para os tecidos. Esta enzima é estimulada por hormônios de maneira particular em cada tecido. A lipase-lipoproteica do tecido adiposo é estimulada pela insulina. Desta forma, os ácidos graxos oriundos da dieta presentes nos quilomícrons e, os ácidos graxos sintetizados no fígado por meio de outros nutrientes energéticos (aminoácidos e moléculas glicídicas) e transportados pela VLDL, serão captados pelo tecido adiposo sob a influência da insulina. Além disso, também sob a influência deste mesmo hormônio, os adipócitos captam glicose e a convertem em ácidos graxos para estocá-los (HERDT; SAYEGH, 2014).

Já a liberação dos ácidos graxos do tecido adiposo, ou seja, a lipólise ocorre quando há estimulação da enzima lipase hormônio sensível. A insulina também atua nessa enzima por causar a desfosforilação da mesma, o que suprime sua ação. Logo, em animais saudáveis a enzima estará ativada nos momentos de jejum, pois há menores concentrações sanguíneas de insulina. Apesar de outras situações como a presença de catecolaminas e moléculas neuroreguladoras estimularem esta enzima e promoverem a lipólise, acredita-se que o efeito inibitório da insulina seja o principal regulador da mobilização de gordura do tecido adiposo (HERDT; SAYEGH, 2014).

Assim, nos quadros de DM, devido à ausência de insulina e menor captação de glicose pelos tecidos insulino-dependentes, há contínua atividade de lipólise e diminuição da lipogênese, ou seja, mais partículas lipídicas circulantes. Logo, ambas as situações justificam a ocorrência de hiperlipidemia em pacientes diabéticos (BEITZ, 2015).

Em humanos com DM tipo 1 são relatadas diferentes modificações no metabolismo lipídico como hiperquilomícronemia, aumento da concentração sanguínea de VLDL e LDL, e baixa de HDL. Isso é atribuído à baixa atividade da enzima lipoproteína-lipase; síntese aumentada de VLDL hepática pela ausência de insulina; menor captação de VLDL e remanescentes de VLDL pelo fígado devido às alterações na composição das apolipoproteínas de superfície da VLDL e/ou glicosilação das mesmas. Além disso, o maior risco de aterosclerose em pacientes humanos diabéticos está associado não só a maior concentração sanguínea de LDL, mas também ao aumento de triglicerídeos presentes nesta lipoproteína, tornando-a ainda menos densa, o que diminui o reconhecimento pelos receptores endoteliais dos tecidos e facilita a oxidação da LDL nas artérias (OKI, 1995).

Estudos que vislumbrem novas possibilidades de tratamento das hiperlipidemias associadas a endocrinopatias são importantes, uma vez que a maioria dos casos relatados de cães com aterosclerose ocorreu em animais endocriopatas (MAHLEY et al., 1977; LIU et al., 1986; KAGAWA et al., 1998; SOTTIAUX, 1999; HESS; KASS; VAN WINKLE, 2003). Também já foi observado que além da hiperglicemia, a hiperlipidemia, inclusive com aumento de ácidos graxos livres, está relacionada a piora do estresse oxidativo em indivíduos diabéticos, o que pode ser fator de envelhecimento precoce e predispor a neoplasias (INOBUCHI et al., 2000; GIACCO; BROWNLEE, 2010; MATSUDA; SHIMOMURA, 2013). Em cães, foi observado que citocinas inflamatórias e hormônios relacionados à inflamação apresentam diferentes concentrações sanguíneas entre animais saudáveis e diabéticos, o que aponta a possibilidade de ocorrer maior inflamação nestes animais doentes (KIM et al., 2015).

Para o tratamento da hiperlipidemia secundária, além da terapia voltada à causa de base, acredita-se que há a possibilidade de modificações dietéticas e o uso de medicamentos. Entretanto, para ambas as terapias, há poucos estudos clínicos e, todos eles avaliaram somente concentrações sanguíneas de triglicerídeos e colesterol como variáveis do metabolismo lipídico (NELSON et al., 1998; GRAHAM et al., 2002; FLEEMAN; RAND; MARKWELL, 2009; TEIXEIRA, 2016; ALBUQUERQUE, 2017; DE MARCO et al., 2017).

Uma possibilidade de tratamento da hiperlipidemia e de modulação das alterações metabólicas observadas em cães diabéticos é a suplementação dietética

de AGPI-3 (LEBLANC et al., 2005; XENOULIS; STEINER, 2015; ALBUQUERQUE, 2017), alternativa ainda não avaliada neste contexto.

### 2.3 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA-3

Os ácidos graxos são definidos como moléculas orgânicas de hidrocarbonetos com uma terminação carboxílica e uma terminação em grupamento metil (GROSS et al., 2010; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). São conhecidos como constituintes dos organismos mais de 50 diferentes ácidos graxos, categorizados de acordo com o número de átomos de carbono presente em sua cadeia, seu grau de saturação e a posição das duplas ligações (GROSS et al., 2010; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

De maneira geral, os ácidos graxos possuem cadeias lineares de 6 a 24 carbonos e aqueles que possuem de 14 a 24 carbonos são categorizados como ácidos graxos de cadeia longa. A presença de duplas ligações na cadeia do ácido graxo irá o identificar como um ácido graxo insaturado e, quando há a partir de duas duplas ligações, são chamados ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (GROSS et al., 2010; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Os AGPI de cadeia longa são classificados em subtipos chamados de série ou família. Esta classificação se dá de acordo com o posicionamento da primeira dupla ligação presente no ácido graxo. Quando contado a partir da terminação do grupamento metil, os ácidos graxos que possuem a primeira dupla ligação entre os carbonos de posição três e quatro são os considerados pertencentes à série ômega-3, também chamada de família ômega-3 (GROSS et al., 2010; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Embora os animais tenham alta capacidade de sintetizar e modificar estruturalmente os ácidos graxos, os mamíferos não têm as enzimas necessárias para gerar duplas ligações nas posições dos carbonos 3 e 6. Desta forma, estes ácidos graxos devem ser fornecidos na dieta, o que os tornam ácidos graxos essenciais. As famílias dos AGPI ômega-6 e ômega-3 são derivadas, respectivamente, do ácido linoléico ( $18:2n-6$ ) e do ácido  $\alpha$ -linolênico ( $18:3n-3$ ). Este, por sua vez, é o precursor dos ácidos graxos que dão origem ao eicosapentaenóico (EPA;  $20:5n-3$ ) e docosahexaenóico (DHA;  $22:6n-3$ ) (GROSS et al., 2010; HILL; WYSE; ANDERSON,

2012), aos quais se atribui os possíveis benefícios metabólicos da suplementação de AGPI-3 (BAUER, 2011).

A principal fonte destes AGPI-3 é o óleo de peixes provenientes de águas marinhas. Estes se diferem dos demais óleos devido à grande concentração de AGPI de cadeia longa (20 a 24 carbonos), com média de 18,0% do óleo como EPA e 12,0% como DHA (BRUM et al., 2002).

Os efeitos benéficos dos AGPI-3, principalmente EPA e DHA, foram reconhecidos pela primeira vez no final dos anos 1960, quando evidências epidemiológicas, de uma determinada população humana que consumia dieta com alta inclusão de EPA e DHA, mostraram que eles apresentavam baixa incidência de infarto do miocárdio (KROMANN; GREEN, 1980; ENDO; ARITA, 2016). Estudos seguintes ao avaliarem a composição da dieta e as diferenças no perfil de lipídeos de humanos relacionaram as menores concentrações de triglicerídeos, colesterol e diferentes perfis de lipoproteínas de esquimós às suas dietas ricas em AGPI-3 oriundos de animais marinhos, em comparação à alimentação de populações dinamarquesas que apresentavam mesmo teor de gordura, porém com diferença no perfil de ácidos graxos dietéticos (BANG; DYERBERG; HJØRNE, 1976).

Tais efeitos hipolipemiantes foram avaliados em estudos na medicina humana (ANIL, 2007) e em alguns estudos com cães adultos saudáveis (LEBLANC et al., 2005; WRIGHT-RODGERS et al., 2005; ARAUJO et al., 2012), saudáveis idosos (HALL et al., 1999; DE GODOY; MCLEOD; HARMON, 2018) e na hiperlipidemia do Schnauzer (ALBUQUERQUE, 2017). Entretanto, em outros trabalhos, a suplementação não teve efeitos significativos na concentração sanguínea de triglicerídeos e colesterol (HARRIS, 1997; MAZAKI-TOVI; ABOOD; SCHENCK, 2014; BARROUIN-MELO et al., 2016; COSTA-SANTOS et al., 2019).

Para cães com hiperlipidemia, foi encontrado apenas um estudo que avaliou Schnauzers com hiperlipidemia primária. Dez animais receberam 1000mg de óleo de peixe (412,0mg de EPA e 318,1mg de DHA) por dia durante 90 dias, associados a dieta coadjuvante para tratamento da obesidade (mínimo 8,3% de extrato etéreo e máximo 11,1% de matéria fibrosa, ambos com base na matéria seca). No mesmo estudo, oito Schnauzers hiperlipidêmicos receberam mesma suplementação de AGPI-3 porém sem modificação na sua alimentação original, que não poderia ser baseada em alimentos caseiros ou hipocalóricos. Em comparação aos valores basais (quando os animais recebiam as suas dietas originais, sem as modificações dietéticas), houve

diminuição da trigliceridemia e da colesterolemia dos cães, recebendo o alimento hipocalórico ou não (ALBUQUERQUE, 2017).

Além do uso terapêutico à hiperlipidemia, aventa-se a possibilidade da suplementação dos AGPI-3 também ter efeito benéfico no controle glicêmico, evidência observada em ratos e humanos (FRIEDBERG et al., 1998; OOSTING et al., 2010). Os efeitos dos AGPI-3 provenientes do óleo de peixe foram avaliados em apenas um estudo com cães saudáveis, no qual a suplementação promoveu mudança no perfil de lipídios da membrana celular dos eritrócitos, porém sem resultar em alterações nas variáveis glicêmicas e insulinêmicas no teste de tolerância oral à glicose. Neste estudo, um cão apresentou hiperinsulinemia e certo grau de resistência insulínica antes de receber os AGPI-3, com melhora na sensibilidade à insulina após a suplementação com estes nutrientes (IRVINE et al., 2002). A melhora da sensibilidade insulínica após recebimento de AGPI-3 foi observada em humanos e associada com menor liberação de ácidos graxos não esterificados dos adipócitos e à ação agonista dos AGPI-3 em fatores de transcrição nucleares como PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$ , relacionados à sensibilidade insulínica hepática e muscular e, a menor inflamação do tecido adiposo verificada pela menor produção de citocinas inflamatórias, também relacionadas à resistência insulínica (OH et al., 2010; ALBERT et al., 2014). Evidências sugerem que alguns tipos celulares possuem receptores de proteínas G específicos – receptor GPR-120 – que funcionam como receptores para AGPI-3 (OH et al., 2010). Os receptores de proteínas G são iniciadores comuns de cascatas metabólicas, alguns ativados por neurotransmissores e outros por ligantes especiais (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). Neste caso, os GPR-120 estimulam respostas intracelulares em monócitos e macrófagos, o que causa ampla minimização da inflamação, com relação direta de maior sensibilização a insulina a ponto de serem considerados fatores antidiabéticos (OH et al., 2010).

O exato mecanismo dos AGPI-3 como hipolipemiantes não está totalmente elucidado, mas há hipóteses que incluem a regulação de fatores de transcrição relacionados à lipogênese; aumento da  $\beta$ -oxidação; estímulo à atividade da enzima lipoproteína lípase; diminuição da absorção de colesterol e redução da concentração de ácidos graxos não esterificados; diminuição da absorção intestinal de glicose e lipídios; e por fim, aumento da secreção de colesterol via bile (SCHENCK, 2005; TOTH; DAYSPRING; POKRYWKA, 2009; WATTS; KARPE, 2011; DENG et al., 2015; XENOULIS; STEINER, 2015).

Semelhante ao que ocorre em outros mamíferos com alterações na viscosidade da bile na vesícula biliar, a análise de metabólômica sugere que cães diabéticos apresentam alteração no metabolismo dos ácidos biliares (O'KELL et al., 2017). Há também evidências de que as endocrinopatias caninas alteram a viscosidade da bile a ponto de gerar lama biliar (COOK; JAMBHEKAR; DYLEWSKI, 2016). Esta seria ocasionada pelas alterações lipídicas endócrinas, que parecem estar relacionadas com a ocorrência de outra enfermidade no cão: a mucocele (KUTSUNAI et al., 2014). Os efeitos dos AGPI-3 sobre o metabolismo lipídico parecem repercutir sobre a dinâmica da vesícula biliar em humanos (WATANABE; GIMBEL; JOHNSTON, 1962; BERR et al., 1992; MÉNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2001; CARIATI; PIROMALLI, 2013), macacos (SCOBAY et al., 1991), e em cães-da-pradaria (*Cynomys ludovicianus*) (BOOKER; SCOTT; LA MORTE, 1990; MAGNUSON et al., 1995), sem avaliações em canídeos. Entretanto, na literatura, já é possível encontrar relatos de casos de sucesso no tratamento clínico de mucocele da vesícula biliar canina, em que os autores associaram a suplementação de óleo de peixe ao protocolo instituído no paciente (WALTER et al., 2008).

Logo, há indícios de que a inclusão dietética de AGPI-3 resulta em modificações em todo o metabolismo lipídico, entretanto para pacientes diabéticos humanos estas evidências ainda são controversas (FRIEDBERG et al., 1998; HAMDY; BARAKATUN-NISAK, 2016) e para cães diabéticos esse aspecto não foi investigado.

Apesar dos dados ainda serem controversos, algumas agências ligadas a saúde, como a Organização Mundial da Saúde, a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United States*), a AHA (*American Heart Association*), dentre outras, recomendam que a ingestão de alimentos de origem marinha, que apresentam em sua composição alta concentração de AGPI-3, seja aumentada, ou mesmo seja realizada suplementação, para que haja maior ingestão de ômega-3 (HARRIS, 2007; THOMPSON; AMOROSO, 2014). Com isso, há diversos questionamentos sobre o impacto ambiental do aumento do consumo de frutos do mar, bem como o uso de óleo de peixe na suplementação humana *per se* ou indiretamente no acréscimo do ingrediente em alimentos industrializados. Tais questionamentos são baseados na menor capacidade de exploração oceânica pelas atividades pesqueiras, devido a importante redução do número de peixes nos mares (JENKINS et al., 2009; GREENE et al., 2013; FARMERY et al., 2018). Além da dificuldade de produção em cativeiro



dos peixes ricos em AGPI-3, principalmente, dos carnívoros (SPRAGUE; DICK; TOCHER, 2016).

Diante do exposto, são necessários estudos que foquem no metabolismo lipídico de animais com DM, uma vez que a quantidade e a composição de ácidos graxos neste macronutriente parecem resultar em benefícios para este grupo de pacientes. A escassez de evidências científicas favoráveis ou contrárias à prescrição de suplementação nutricional às diferentes doenças faz com que na prática clínica estas sejam realizadas de maneira empírica, com gastos financeiros e impactos ambientais que talvez sejam desnecessários. Entender de maneira mais aprofundada o metabolismo lipídico desses pacientes também pode servir como biomarcador precoce do DM para cães e servir como modelo de interesse para a doença na medicina humana.



### **3 HIPÓTESE**

Devido às evidências de que os AGPI-3 EPA e DHA podem atenuar alterações metabólicas, a hipótese do presente estudo é que um alimento enriquecido com óleo de peixe, importante fonte destes ácidos graxos, será capaz de reduzir a concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol; modificar o perfil de lipoproteínas plasmáticas e a velocidade de esvaziamento da vesícula biliar; além de minimizar a glicemia de cães diabéticos.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 PRINCIPAL

Avaliar os efeitos da suplementação do AGPI-3 EPA e DHA na concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol de cães diabéticos.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da suplementação de EPA e DHA no perfil de lipoproteínas de cães diabéticos;
- Analisar as possíveis alterações glicêmicas de cães diabéticos após a suplementação com AGPI-3;
- Comparar o tempo de esvaziamento da vesícula biliar de cães diabéticos com e sem suplementação de óleo de peixe.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Todo o protocolo experimental deste projeto foi conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) (protocolo CEUA número 7943060716) e após prévia autorização dos proprietários dos cães incluídos na pesquisa sob termo de consentimento livre e esclarecido disponibilizado.

Os animais utilizados no estudo foram selecionados na rotina do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET/FMVZ-USP), de acordo com os critérios de inclusão: cães acometidos por DM, fêmeas (castradas) ou machos, acima de um ano de idade, sem outras afecções concomitantes, com escore de condição corporal (ECC) entre 4 e 6, na escala de 1 a 9 (LAFLAMME, 1997), e pertencentes a proprietários com disponibilidade e comprometimento de seguir todo o protocolo experimental. Para a seleção foram realizados anamnese, exame físico, pesagem, determinação do ECC, coleta de sangue para análises laboratoriais [hemograma; concentração sérica de creatinina, ureia, proteínas totais e albumina; e atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA)] e coleta de urina para exame I (físico-químico) e II (cultura e antibiograma).

### 5.2 DIETAS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados no estudo três alimentos secos extrusados. O primeiro, aqui chamado de alimento “Basal” (Ba), apresentava como características principais o alto conteúdo de fibra e proteína, moderado em gordura e amido, ou seja, perfil semelhante ao comumente recomendado para manejo alimentar de cães diabéticos. Este alimento foi utilizado apenas no período de estabilização do DM.

Nos períodos experimentais, foram utilizados os alimentos testes, aqui nomeados “Alimento controle” (C), “Alimento teste” (A). Os três alimentos experimentais foram formulados com fontes de amido de digestão lenta (ervilha e

cevada), alto conteúdo de fibra e com conteúdo moderado de gordura, de modo a tornarem-se semelhantes em sua composição química e de ingredientes (Tabela 1). A diferença entre os alimentos está em seu conteúdo de ômega-3, incluído sob a forma de óleo de peixe. A ração C não apresentou em sua composição óleo de peixe, enquanto em A foi realizada a inclusão de 5,0% deste ingrediente. Para que os alimentos apresentassem concentrações similares de extrato etéreo e ácidos graxos (Tabela 2), principalmente ômega-6, a quantidade acrescida de óleo de peixe foi proporcionalmente descontada da gordura de frango. Nos dois alimentos a suplementação de minerais e vitaminas foi a mesma. Como o estudo ocorreu por longo período de tempo, foram utilizados três lotes do alimento C e dois lotes do alimento A.

Tabela 1 – Composição química (em matéria seca) dos alimentos e lotes empregados no estudo.

<i>Item</i>	<i>C (lote 1)</i>	<i>C (lote 2)</i>	<i>C (lote 3)</i>	<i>A (lote 1)</i>	<i>A (lote2)</i>
Proteína bruta (%)	35,60	36,25	37,25	36,56	37,40
Amido (%)	18,98	18,67	20,15	21,08	20,16
Extrato etéreo (%)	15,83	16,53	16,54	18,15	18,54
Fibra bruta (%)	2,05	6,74	4,40	6,33	0,66
Fibra dietética total (%) <sup>‡</sup>		29,88		29,31	
Matéria mineral (%)	6,65	6,21	6,68	6,10	6,23
Ômega-6 (%)	3,75	3,96	3,58	3,46	3,67
Ômega-3 (%)	0,45	0,56	0,48	1,43	1,70
EPA (%)	0,04	0,02	0,02	0,48	0,60
DHA (%)	0,04	0,03	0,02	0,37	0,47
Energia metabolizável (kcal/kg)	4,25	3,95	4,11	4,05	4,51

----- INGREDIENTES -----

Glúten de trigo, farinha de ervilha, cevada, gordura suína, plasma suíno em pó, ovo desidratado, farinha de ervilha, cevada, quirera de arroz, gelatina hidrolisada, L-carnitina, farinha de vísceras de frango, proteína isolada de suíno, celulose, polpa de beterraba, gordura de frango, óleo de peixe\*, hidrolisado de frango, ácido propiônico, antioxidante BHA, cloreto de potássio, cloreto de sódio, extrato de yucca, frutoligossacarídeos, levedura seca de cervejaria, mananoligossacarídeos, parede celular de levedura, premix mineral transquelatado (cobre, ferro, iodo, manganês, selênio, zinco), premix vitamínico (ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, colina, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3), taurina.

\*Ausente no alimento C, inclusão de 5,0% no alimento A.

Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: C = alimento controle; A = alimento teste; <sup>‡</sup>Análise realizada no alimento C lote 2 e A lote 1. EPA=ácido eicosapentaenóico. DHA=ácido docosaexaenóico.



Tabela 2 – Perfil dos ácidos graxos dos alimentos controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe) utilizados no estudo\* e percentual de diferença entre A e C.

Ácidos graxos	C	A	Diferença entre A e C (%)
Saturados	4,34	4,42	1,90
Monoinsaturados	5,71	5,37	-5,95
Poli-insaturados	4,15	4,36	5,25
Ômega-3	0,52	1,18	127,54
Ômega-6	3,63	3,18	-12,39
Trans-isômeros totais	0,06	0,09	44,00
C12:0 (láurico)	0,01	0,01	0,00
C14:0 (mirístico)	0,10	0,27	165,85
C14:1 ômega-5 (miristoleico)	0,01	0,01	0,00
C15:0 (pentadecanóico)	0,01	0,02	80,00
C16:0 (palmítico)	3,08	3,01	-2,11
C16:1 ômega-7 (palmitoleico)	0,56	0,67	20,09
C17:0 (margárico)	0,03	0,05	50,00
C17:1 (cis-10-heptadecanóico)	0,02	0,05	125,00
C18:0 (esteárico)	1,04	0,98	-6,02
C18:1 ômega-9t ( <i>trans</i> -9-octadecenóico)	0,06	0,04	-39,13
C18:1 ômega-9 (oleico)	5,04	4,54	-10,06
C18:2 ômega-6t ( <i>trans</i> linoleico)	0,01	0,06	450,00
C18:2 ômega-6 (linoleico)	3,55	3,10	-12,81
C20:0 (araquídico)	0,03	0,03	0,00
C18:3 ômega-6 $\gamma$ (gama linolênico)	0,02	0,02	0,00
C18:3 ômega-3 $\alpha$ (alfa linolênico)	0,30	0,28	-6,67
C20:1 ômega-11 (cis-11-eicosenóico)	0,06	0,08	39,13
C20:2 ômega-6 (cis-11,14-eicosadienóico)	0,04	0,04	0,00
C22:0 (behênico)	0,02	0,02	12,50
C20:3 ômega-6 (cis-8,11,14-eicosatrienóico)	0,03	0,04	16,67
C22:1 ômega-9 (erúcico)	nd	nd	-
C20:3 ômega-3 (cis-11,14,17-eicosatrienóico)	0,15	0,18	18,64
C20:4 ômega-6 (araquidônico)	nd	0,01	-
C20:5 ômega-3 (cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico)	0,02	0,38	1577,78
C24:0 (lignocérico)	0,02	0,02	0,00
C24:1 (nervônico)	0,02	0,03	33,33
C22:5 ômega-3 (cis-7,10,13,16,19-docosapentaenóico)	0,02	0,06	155,56
C22:6 ômega-3 (cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico)	0,03	0,29	792,31

Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: \*análise realizada no lote 2 dos dois alimentos.

Os alimentos foram formulados em *software* específico e extrusados na fábrica de ração da empresa Grandfood Indústria e Comércio LTDA, localizada no município de Dourado/SP. As análises bromatológicas de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta e extrato etéreo em hidrólise ácida foram realizadas segundo AOAC (1995); a fibra dietética total (FDT) de acordo com o método de Prosky et al. (1992) e

o amido total conforme Hendrix (1993). Estas análises foram realizadas no Centro de Desenvolvimento Nutricional e Laboratório Químico da empresa Grandfood Indústria e Comércio LTDA. A análise da concentração de ácidos graxos foi realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), segundo método descrito pela AOCS (2014). A energia metabolizável foi estimada pela fórmula matemática recomendada pelo NRC (2006).

Na tentativa de estabelecimento de dose dos AGPI-3 EPA e DHA, com base nas checagens da quantidade de alimento fornecida aos cães, foi calculada a ingestão diária de EPA e DHA, de acordo com respectivo lote que cada animal recebia em cada momento do estudo. Esse valor foi dividido pelo peso corporal e pelo peso metabólico dos cães, nos 90<sup>o</sup> dias (dia da coleta de sangue) dos respectivos períodos experimentais. Também foi realizado o cálculo de ingestão de matéria seca, nutrientes e energia.

### 5.3 ESTABILIZAÇÃO DO DIABETES MELLITUS

Com o objetivo de minimizar as manifestações da doença, controlar a glicemia e determinar qual a melhor dose de insulina, antes de serem submetidos ao protocolo experimental propriamente dito, os animais passaram por período de estabilização do DM no qual receberam o alimento basal (Ba).

O cálculo inicial da prescrição alimentar foi baseado na estimativa da necessidade energética de manutenção (NEM) de acordo com a fórmula  $NEM = 95 \times PC^{0,75}$  [PC = peso corporal; (NRC, 2006)]. Essa estimativa da NEM foi então dividida pela energia metabolizável do alimento (kcal/gramas), o que gerou o resultado em gramas a serem consumidos pelos cães diariamente. Os proprietários foram instruídos a dividir essa quantidade em duas refeições diárias, com intervalo de 12 horas, e após cada refeição realizar a aplicação da insulina. A dose inicial de insulina utilizada foi de 0,25U/kg de peso corporal, a cada 12 horas (RUCINSKY et al., 2010). Todos os animais recebiam insulina do tipo NPH.

Para estabilização do paciente diabético, os animais foram avaliados a cada 15 dias para averiguar a necessidade de ajustes na quantidade de alimento ou na dose de insulina. Os ajustes na dose de insulina foram realizados quando as manifestações clínicas de hipoglicemia (apatia, sonolência, convulsões) ou hiperglicemia (poliúria e

olidipsia) eram relatadas pelos proprietários, associados ao valor mensurado da glicemia antes da alimentação e seis horas após a administração da insulina. A quantidade de alimento era alterada, com ajustes de 10,0% a mais ou a menos, caso o animal apresentasse perda ou ganho de mais de 5,0% do seu peso, sob a mesma dose de insulina.

Os animais foram considerados estáveis após período de três retornos consecutivos sem manifestações de poliúria e polidipsia e com valores de glicemia que oscilassem entre 90 e 300mg/dL (RUCINSKY et al., 2010), mensurados no aparelho portátil Accu Chek Active (Roche<sup>1</sup>), validado para uso em cães (JOHNSON et al., 2009).

A partir do momento em que o DM foi considerado estável, os animais eram mantidos 60 dias recebendo o alimento Ba – sem alteração na dose de insulina – para serem incluídos no protocolo experimental propriamente dito.

#### 5.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após a fase de estabilização, os animais iniciavam o protocolo experimental propriamente dito, no qual passavam pelos dois períodos experimentais, constituído por 90 dias cada, nos quais receberam os dois alimentos sob delineamento randomizado, *cross-over* e duplo cego. Para isso, os alimentos foram denominados com as letras A e C por indivíduo alheio à entrega das rações aos proprietários e a sequência de recebimento dos alimentos foi randomizada no software Excel (versão 2015)<sup>2</sup>. Desta forma, os pesquisadores e os proprietários não sabiam qual alimento os animais estavam recebendo em cada período experimental.

No 75<sup>o</sup> dia de cada período experimental os proprietários participantes conduziram seus animais ao HOVET-FMVZ/USP para colocação do sensor do sistema de mensuração contínua de glicemia (SMCG) e no final de cada período experimental (90<sup>o</sup> dia), os animais eram submetidos aos procedimentos de coleta de dados e materiais biológicos. Para estas avaliações, os cães retornavam ao HOVET-FMVZ/USP sob jejum alimentar de 12 horas. Inicialmente era realizada coleta de 10mL de sangue, por venopunção da veia jugular. Este era distribuído em tubos do

---

<sup>1</sup>Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha.

<sup>2</sup>Microsoft Office, Chicago, Estados Unidos da América.

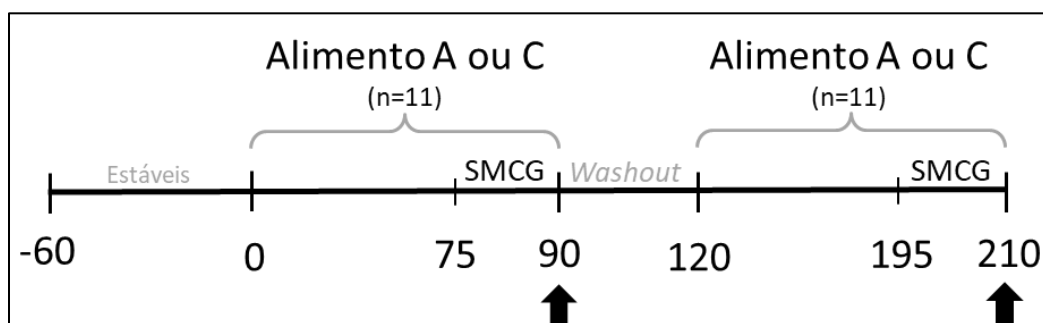
tipo *vacutainer* com EDTA, gel ativador de coagulação e tubo com EDTA e fluoreto de sódio. O sangue total não coagulado era enviado para realização de hemograma e, em seguida, a amostra era centrifugada a 3500rpm, por 5 minutos, para separação do plasma em alíquotas de 400µL em criotubos, congelados a -80°C, para posterior análise de lipoproteínas. O *vacutainer* com sangue coagulado era centrifugado também a 3500rpm por 5 minutos para separação do soro, que era fracionado em alíquotas de 400µL para mensuração das concentrações séricas de albumina, proteínas totais, creatinina, ureia e atividade sérica das enzimas ALT e FA; como forma de avaliar a saúde dos animais.

Posteriormente, os cães eram submetidos a exame de ultrassonografia abdominal para estimativa do volume da vesícula biliar. Em seguida, recebiam alimentação e a insulina era administrada. Nos tempos 30, 60 e 120 minutos após alimentação, o volume da vesícula biliar era reavaliado por meio da ultrassonografia abdominal. Neste interim, o sensor do SMCG era removido.

Ainda no 90º dia de cada período experimental, a cada duas horas, a contar do momento antes da refeição, era realizada a curva glicêmica de 10 horas, e avaliação da trigliceridemia e colesterolemia dos animais. Ou seja, no 90º dia de cada período experimental, os animais eram mantidos por 10 horas no HOVET-FMVZ/USP.

Após finalização destes exames no 90º dia, antes do próximo período experimental, os animais recebiam por 30 dias o alimento controle, como forma de minimizar o efeito cumulativo de tempo de recebimento de AGPI-3 sobre as variáveis analisadas. Sendo assim, o protocolo de estudo empregado foi constituído de dois períodos experimentais de 90 dias e um período de *washout* de 30 dias, ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema ilustrativo das etapas experimentais do estudo.



Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: SMCG = implantação do sistema de mensuração contínua de glicemia. Setas = coletas de sangue e avaliação do esvaziamento da vesícula biliar.

Durante os períodos experimentais (90 dias cada), os animais retornavam ao HOVET-FMVZ/USP a cada 20 dias para acompanhamento clínico, onde o proprietário era questionado principalmente sobre o manejo alimentar, manejo insulínico e manifestações clínicas relacionadas ao volume de urina e quantidade de água ingerida; o animal era pesado e sua glicemia capilar mensurada. A quantidade de alimento era aumentada ou diminuída se houvesse, respectivamente, perda ou ganho de peso maior que 5,0%. Foi determinado que a dose de insulina estabelecida como adequada durante a fase de estabilização fosse mantida a mesma durante todo o estudo, exceto nos casos de ocorrência de manifestações clínicas evidentes de hiperglicemia (principalmente poliúria e polidipsia) ou hipoglicemia (apatia, sonolência e convulsão) relatados pelo proprietário.

Para conferência do manejo efetuado pelo proprietário em seu domicílio, foi solicitado que nos retornos o mesmo levasse ao HOVET-FMVZ/USP a quantidade habitual de alimento que fornece por refeição, para ser pesada, bem como a seringa de insulina com o volume aplicado.

## 5.5 CURVAS DE TRIGLICERIDEMIA, COLESTEROLEMIA E GLICEMIA

A curva de 10 horas de glicemia, trigliceridemia e colesterolemia dos animais consistiu na coleta de sangue antes da alimentação [amostra em jejum, tempo 0 (t<sub>0</sub>)], e a cada duas horas pós-prandial (t<sub>2</sub>, t<sub>4</sub>, t<sub>6</sub>, t<sub>8</sub> e t<sub>10</sub>) para mensuração da concentração destes metabólitos.

Para isso, amostras de 1mL de sangue foram coletadas e acondicionadas em tubo *vacutainer* com EDTA e fluoreto de sódio, imediatamente homogeneizadas, e centrifugadas a 3500rpm, por 4 minutos, no período máximo de 2 horas após a coleta de sangue. O plasma resultante era separado em microtubos cônicos identificados e congelados a -20° C para posterior análise.

Destas curvas, além das concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos e colesterol em cada um dos seis pontos avaliados, foram obtidas as variáveis: concentração média, mínima, máxima, diferença entre concentração máxima e mínima, e a área abaixo de cada curva, para cada metabólito.

## 5.6 ANÁLISES LABORATORIAIS

Todas as análises laboratoriais deste tópico foram realizadas no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/HOVET-FMVZ/USP, São Paulo – SP, conforme a rotina habitual do local.

Os hemogramas eram realizados em contador eletrônico, para uso veterinário, da marca ADVIA 2120b<sup>1</sup>. O hematócrito determinado por meio de tubos microcapilares. A contagem diferencial dos leucócitos por microscopia óptica do esfregaço sanguíneo.

As concentrações séricas de creatinina foram mensuradas por meio do emprego de kit comercial da marca Labtest<sup>2</sup>, pelo método picrato alcalino. A atividade sérica da ALT analisada por meio do emprego do kit comercial da marca Biosystems<sup>3</sup>, método IFCC; e da FA com o emprego de kit comercial da marca Biosystems<sup>3</sup>, método IFCC/SEQC. As análises de triglicerídeos plasmáticos pelo emprego de kit comercial da marca Biosystems<sup>3</sup>, método glicerol fosfato oxidase/peroxidase e de colesterol por meio do kit comercial da marca Biosystems<sup>3</sup>, pelo método enzimático oxidase/peroxidase. A ureia sérica pelo emprego do kit comercial da marca Diasys<sup>4</sup>, método enzimático FS urease GLDH. A albumina por meio do kit comercial da marca Labtest, método verde de bromocresol, e as proteínas totais por meio do kit comercial da marca Labtest, método do biureto. As concentrações de glicose plasmática para a curva glicêmica convencional de 10hs foram mensuradas pelo método peroxidase/oxidase, kit comercial Labtest.

## 5.7 CARACTERIZAÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Para a quantificação do perfil plasmático de lipoproteínas, antes do congelamento da amostra a -80°C, fora adicionada as seguintes soluções conservantes: benzamidina a 2mM (Sigma<sup>5</sup> B-6506), 5µL/mL de plasma; gentamicina

---

<sup>1</sup> Siemens, Erlangen, Alemanha.

<sup>2</sup> Labtest, Lagoa Santa, Brasil.

<sup>3</sup> Biosystem S.A., Barcelona, Espanha.

<sup>4</sup> Diasys – Diagnostic System, Holzheim, Alemanha.

<sup>5</sup> Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha.

a 0,5% e cloranfenicol a 0,25%, 20 $\mu$ L desta solução/mL de plasma; aprotinina (Sigma A-6270), 5 $\mu$ L/mL de plasma; e PMSF a 0,5mM (Sigma p-7626), 0,5 $\mu$ L/mL de plasma.

As determinações foram realizadas por cromatografia em gel de filtração, pelo método de cromatografia líquida para separação rápida de proteínas (FPLC), no sistema de cromatografia líquida AKTA *Purifier* (GE Healthcare<sup>1</sup>). Para a execução desta etapa, 100 $\mu$ L de plasma foram injetados na coluna Superose 6HR 10/30 (GE Healthcare 17-5172-01) e a eluição ocorreu em fluxo constante de 0,5mL/minuto em meio tampão Tris (Tris 10mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM e NaN<sub>3</sub> 0,03%, pH 7,0). Foram coletadas frações de 0,2mL em placas de 96 poços utilizando o coletor de frações automático. As moléculas de colesterol e triglicerídeos das frações separadas foram dosadas por método enzimático-colorimétrico com kits comerciais Labtest<sup>2</sup> para a determinação das lipoproteínas VLDL, LDL e HDL. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Lipídeos, LIM-10, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

A distribuição percentual de colesterol e triglicerídeos foi calculada pela área abaixo da curva dos picos das frações de lipoproteínas obtidas pelo FPLC, e posteriormente convertidos a números absolutos. A quantidade e proporção de colesterol em lipoproteínas que não são HDL (não-HDL-c) foi calculada pela subtração da quantidade de HDL-colesterol da quantidade de colesterol total.

## 5.8 CURVA GLICÊMICA POR MENSURAÇÃO CONTÍNUA

Além da curva glicêmica convencional, também foi realizada a curva glicêmica com o uso do sistema de mensuração contínua de glicemia. Nesta forma de avaliação glicêmica dos cães diabéticos é mensurada a concentração intersticial de glicose, e não sanguíneas, porém o termo glicemia e suas variações serão utilizados nesta tese, também para este método.

As curvas glicêmicas contínuas foram realizadas com a utilização do SMCG Freestyle Libre da marca Abbott<sup>3</sup>, também descrito como “sistema flash de monitoramento de glicemia” (CORRADINI et al., 2016; MALERBA et al., 2020). Para

---

<sup>1</sup>Bio-Sciences, Uppsala, Suécia.

<sup>2</sup>Labtest, Lagoa Santa, Brasil.

<sup>3</sup>Freestyle Libre, Abbott, Reino Unido.

posicionamento do sensor deste sistema no subcutâneo do animal, primeiramente realizou-se a tricotomia em região lateral do pescoço, seguindo o descrito por Corradini et al. (2016). Após tricotomia, fez-se a higienização da região com lenço umedecido em álcool (fornecido pelo fabricante) para introdução do sensor, seguindo as instruções do fabricante (Figura 2A). Após sensor posicionado (Figura 2B), realizou-se a ativação do leitor deste sistema, para que após 60 minutos – tempo necessário para adequada lubrificação do sensor pelo líquido intersticial – fosse iniciada a mensuração da concentração de glicose intersticial. Além da fita adesiva já acoplada ao sensor, para correta manutenção do mesmo no paciente, de modo a evitar deslocamentos ou remoção precoce pelo animal, após posicionado nos animais o sensor era recoberto por quadrado de 10 x 10cm de fita adesiva do tipo micropore (Figura 2C), faixa do tipo atadura, malha auto-adesiva e fita adesiva do tipo esparadrapo (Figura 2**Erro! Fonte de referência não encontrada.**D).

Com sensor bem afixado, os animais eram liberados para sua casa e retornavam em 14 dias para retirada do sensor. O proprietário recebia uma ficha para anotar os horários exatos sobre a rotina dos cães, como momento da alimentação, administração de insulina e atividade física.

A expectativa era que com a manutenção do SMCG no paciente por 14 dias, haveria o registro de 20.160 minutos. O SMCG Freestyle Libre registra a glicemia a cada 15 minutos, ou seja, a curva glicêmica deve ser composta por 1344 pontos. Para adequado armazenamento destas médias, segundo o fabricante, deve ser realizada no mínimo um escaneamento da glicemia (passagem do leitor sobre o sensor com no máximo 4 centímetros de distância, semelhante a “leitura” de um código de barras) a cada 8 horas. De modo a evitar equívocos pelos proprietários, os mesmos foram orientados a realizar no mínimo quatro escaneamentos, com intervalo de 6 horas. Para o adequado delineamento da pesquisa, uma vez que o horário de alimentação foi anotado pelos proprietários, padronizou-se que o início da curva glicêmica de 336 horas (momento m0) seria a quinta mensuração da glicemia (1 hora) antes da primeira refeição diária. Sendo assim, as curvas glicêmicas tiveram início sempre antes da primeira refeição do dia, em todos os animais, nos dois tratamentos, seguindo o previamente padronizado por este grupo de pesquisa (TEIXEIRA et al., 2018).

Por meio desta curva glicêmica, foram analisadas as variáveis: glicemia média total; média diurna diária; média noturna diária; em jejum diurno diário; em jejum noturno diário; máxima diurna diária; máxima noturna diária; mínima diurna diária;



mínima noturna diária; diferença entre máxima e mínima diurnas diárias; diferença entre máxima e mínima noturnas diárias; área abaixo da curva glicêmica (AACG); e tempo em hipoglicemia e hiperglicemia.

Figura 2 – Etapas envolvidas na colocação do sensor do sistema de mensuração contínua de glicemia Freestyle Libre nos animais.



Fonte: Teixeira, F.A. (2018).

Legenda: A) Aplicação do sensor em região tricotomizada e higienizada; B) Sensor fixado no paciente pela fita adesiva do próprio sensor; C) Fixação do SMCG no animal por micropore; D) Fixação do SMCG com faixas e atadura.

A glicemia média total foi definida como a média da concentração de glicose intersticial mensurada a cada 15 minutos pelo SMCG em todo o período avaliado. A glicemia média diurna foi considerada como a média dos valores glicêmicos obtidos entre m0 de cada dia [as cinco primeiras glicemias (1 hora) antes da primeira refeição diária] e o momento 12 horas (m12) de cada dia (1 hora antes da segunda refeição diária). A glicemia média noturna foi considerada como a média dos valores glicêmicos

obtidos entre m12 de um dia e m0 do dia seguinte. A glicemia em jejum diurno, foi considerada como a média das cinco mensurações antes do momento da primeira refeição diária, ou seja, às cinco primeiras glicemias diárias, a partir de m0 de cada dia. A glicemia em jejum noturno foi a média das cinco mensurações antes do momento da segunda refeição diária, ou seja, as cinco primeiras glicemias diárias, a partir de m12 de cada dia. A glicemia máxima diurna, foi considerada como o maior valor glicêmico no período de 12 horas entre m0 e m12; assim como a glicemia máxima noturna, foi considerada como o maior valor glicêmico no período de 12 horas entre m12 de um dia e m0 do dia seguinte. A glicemia mínima diurna, foi estabelecida como o menor valor glicêmico no período de 12 horas entre m0 e m12; assim como a glicemia mínima noturna, o menor valor glicêmico no período de 12 horas entre m12 de um dia e m0 do dia seguinte. A diferença entre a glicemia máxima e mínima de cada período, diurno (m0 a m12) e noturno (m12 a m0), foi calculada pela subtração do menor valor de cada período do valor máximo do respectivo período.

A AACG significa a área da figura geométrica que se forma abaixo da curva e foi calculada para todo o período pela integração numérica (método trapezoidal), por meio do software R Core Team<sup>1</sup>.

O cálculo da frequência de tempo em hipoglicemia (menor que 90mg/dL) ou hiperglicemia (maior que 300mg/dL) de cada animal foi efetuado por meio da contagem do número de mensurações em hipoglicemia e hiperglicemia, no período todo, dividida pelo total de mensurações de cada animal, para cada alimento. Vale ressaltar que o conceito de hipoglicemia e hiperglicemia não é relativo aos valores de referência para animais saudáveis, mas ao preconizado no estudo como o intervalo de adequado controle para cães diabéticos: 90 a 300mg/dL (RUCINSKY et al., 2010).

## 5.9 ESVAZIAMENTO DA VESÍCULA BILIAR

Ao final de cada período experimental, os animais foram avaliados em jejum e 30, 60 e 120 minutos após a refeição por meio de ultrassonografia abdominal, para determinação do volume da vesícula biliar e posterior definição da fração de ejeção de conteúdo biliar.

---

<sup>1</sup>R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2020.

Para determinação do volume da vesícula biliar, inicialmente os animais foram posicionados em decúbito dorsal e tricotomizados em sua região abdominal, a partir do 11º espaço intercostal, estendendo-se lateralmente alguns centímetros para ambos os lados da linha média. Em seguida, foi aplicado o gel acústico (Ultra-gel Ultra<sup>1</sup>) para a avaliação ultrassonográfica da vesícula biliar. A avaliação ultrassonográfica foi realizada em modo-B, com equipamento Philips Affiniti 70G<sup>2</sup>. A vesícula biliar dos cães foi avaliada com sonda linear de frequência variada entre 5 e 18MHz para animais de pequeno porte, microconvexa de 5 a 8MHz para porte médio ou sonda convexa de 1 a 5MHz para porte grande. Em cada animal, nos diferentes momentos avaliados, usou-se a mesma sonda.

O volume da vesícula biliar foi obtido pelo método elipsoide previamente descrito (TSUKAGOSHI et al., 2012). Para isso, o comprimento máximo (C) e a altura máxima (A) foram mensurados no corte longitudinal e largura máxima (L) no corte transversal. Tais mensurações foram realizadas em triplicata, o que gerou três volumes de cada vesícula biliar, em cada momento avaliado. Os volumes (V) foram calculados pela fórmula:  $V = 0,52 \times C \times A \times L$ , o que permitiu o cálculo do volume biliar médio, de cada momento.

Já a fração de ejeção da vesícula biliar (FE%) do período pós-prandial foi calculada em função do volume em jejum ( $V_0$ ) e dos respectivos volumes obtidos nas mensurações de cada momento pós-prandial ( $V_x$ ), da seguinte forma:  $FE = (V_0 - V_x) \times 100/V_0$  (TSUKAGOSHI et al., 2012). Foi calculada a média da FE entre as três medições de cada momento (30, 60 e 120 minutos).

De modo a manter o modelo de experimento duplo-cego, o operador ultrassonográfico também não teve acesso a informação de qual alimento os animais estavam recebendo em cada momento.

## 5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram utilizadas análises estatísticas, ao final do estudo, para comparação das variáveis entre os dois tratamentos: período sob alimento com e sem inclusão de óleo

---

<sup>1</sup>Multigel, Silvianópolis, Brasil

<sup>2</sup>Royal Philips, Eindhoven, Holanda

de peixe. Os dados foram analisados no software R Core Team (2020). O valor de  $\alpha$  estabelecido para considerar o resultado significativo foi de 0,05 (valor de  $p \leq 0,05$ ).

Os testes estatísticos empregados foram definidos inicialmente de acordo com a aderência à distribuição normal dos dados. Para essa avaliação foi utilizado o teste de Shapiro Wilk para todas as variáveis. Após verificada a aderência à normalidade, o teste t pareado foi utilizado às variáveis com distribuição normal, enquanto o teste de Wilcoxon às variáveis não-normais, para indicar se as mensurações das amostras foram iguais ou diferentes estatisticamente.

Às variáveis tempo em hipoglicemia e tempo em hiperglicemia, por serem proporções, foi utilizado o teste de qui-quadrado para comparação entre proporções.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ANIMAIS

Inicialmente foram selecionados os prontuários de 609 cães com diagnóstico de DM, porém 11 vieram a óbito no início da triagem, que começou com 598 indivíduos. Destes, 408 foram excluídos pela presença de outras doenças: endocrinopatias (n=167), neoplasias (n=82), doença renal crônica (n=24), doenças cardíacas e respiratórias (n=26), dermatopatias (n=15), neuropatias (n=13), doenças ortopédicas (n=12), obesidade (n=12), doenças gastroentéricas (n=11), hepatopatias (n=6), hemoparasitoses (n=3), dentre outras (n=37). O segundo principal motivo de exclusão foi devido a questões relacionados aos tutores (n=157) como impossibilidade de ir ao HOVET-FMVZ/USP na frequência necessária e não seguir as prescrições. Cinco cães diabéticos foram excluídos por serem muito agressivos, três por receberem alimentação caseira e um animal por ter DM juvenil.

Assim, 24 animais iniciaram os períodos experimentais. Destes, dois foram excluídos por desenvolverem hiperadrenocorticismos durante o protocolo experimental; um por desenvolver processo neoplásico palpebral; um por diagnóstico de doença renal crônica estágio 2; um pela impossibilidade da responsável pelo animal em manter as idas ao hospital veterinário e dois por terem sido eutanasiados (um por tetraparesia ocasionada por discopatia e um por neoplasia nasal sem diagnóstico definitivo). Outros seis animais não tiveram seus dados incluídos nas

análises devido a não finalização do protocolo experimental até o prazo de conclusão deste trabalho.

As características individuais dos 11 cães remanescentes estão descritas no Quadro 1, bem como a concentração sérica de triglicerídeos e colesterol mensurada imediatamente antes de serem incluídos no estudo, após o período de estabilização do DM. Com base nas determinações bioquímicas, é possível observar que dentre todos os cães diabéticos, após o período de estabilização, sete eram hiperlipidêmicos apenas por hipercolesterolemia, um apenas por hipertrigliceridemia, dois por ambas as condições e um animal não apresentou hiperlipidemia.

Quadro 1 – Características dos onze animais incluídos no estudo.

ID	Raça	Sexo	Idade (anos)	PC (kg)	ECC	Insulina NPH (unidades/kg PC)		Sequência	Triglicerídeos* (mg/dL)	Colesterol <sup>†</sup> (mg/dL)
						Manhã	Noite			
1	Lhasa apso	MI	11	8,7	5	0,5	0,5	C-A	107,4	443,8
3	Lhasa apso	FC	10	6,1	5	0,5	0,5	A-C	275,9	368,5
6	Schnauzer	MI	9	8,9	4	0,7	0,7	C-A	76,1	196,1
7	SRD	FC	12	6,3	5	0,3	0,3	A-C	88,2	535,6
8	SRD	FC	11	9,9	4	0,5	0,5	C-A	123,1	521,6
9	Labrador	FC	9	32,5	5	0,3	0,3	C-A	52,7	310,5
10	SRD	MI	10	11,4	4	0,5	0,5	A-C	815,6	487,5
11	Maltês	FC	7	3,9	5	0,5	0,3	C-A	1307,0	876,0
14	SRD	MC	8	6,8	6	0,5	0,4	C-A	149,2	371,5
16	Border	FC	13	14,1	5	0,4	0,4	C-A	71,3	317,7
17	Lhasa	FC	8	10,1	5	0,5	0,5	C-A	291,2	240,2

Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: SRD = Sem raça definida; MI = macho intacto; FC = fêmea castrada; MC = macho castrado; PC = peso corporal; ECC = escore de condição corporal na escala de 1 a 9 (LAFLAMME, 1997).

\*Intervalo de referência para cães saudáveis de acordo com o Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/HOVET-FMVZ/USP: <sup>‡</sup>40 a 169mg/dL; <sup>†</sup>125 a 270mg/dL.

Esse achado de maior ocorrência de alterações lipídicas por hipercolesterolemia desta pequena amostra de cães diabéticos também foi observado em estudos que induziram DM em cães saudáveis (FASOLI et al., 1954; WILSON et al., 1986; GLEESON et al., 1990) e em cães com DM naturalmente adquirido (ROGERS; DONOVAN; KOCIBA, 1975; SEAGE; DROBATZ; HESS, 2018).

Dos 11 animais incluídos, os cães ID 8 e ID 11 (Quadro 1) não aceitavam alimentação no HOVET-FMVZ/USP, o que impossibilitou a realização das avaliações

pós-prandiais (curva glicêmica convencional, curva de trigliceridemia e colesterolemia, e mensuração do volume da vesícula biliar).

Foi realizada a comparação do peso dos animais no dia da coleta de sangue, no final de cada período de 90 dias e não foi observada diferença ( $p=0,37$ ) no peso médio dos cães diabéticos ( $n=11$ ) após recebimento do alimento C ( $11,4\pm 9,4\text{kg}$ ) e alimento A ( $11,3\pm 8,9\text{kg}$ ).

## 6.2 INGESTÃO DE NUTRIENTES

Após iniciarem os protocolos experimentais, era solicitado aos proprietários dos cães que, durante as idas ao HOVET-FMVZ/USP, principalmente nos dias das coletas de sangue (90º dia), levassem a quantidade de alimento que era fornecida ao animal, para que fosse pesada e comparada com o que fora previamente prescrito. Como esperado, a ingestão de matéria seca, proteína bruta, amido, fibra (tanto bruta quanto a dietética total), ômega-6 e energia não foi diferente (Tabela 3) entre os alimentos utilizados (C e A) devido a sua similaridade de composição química (Tabela 1), porém houve maior ingestão de gordura, ômega-3, EPA e DHA após período de recebimento do alimento A, comparado ao C.

Além disso, quando receberam o alimento C, os cães ingeriram em média  $8,5\pm 4,1\text{mg}$  de EPA+DHA/kg de peso corporal, equivalente a  $14,9\pm 7,2\text{mg/kg}^{0,75}$ . Após recebimento do alimento A, a ingestão da soma de EPA e DHA pelos cães foi de  $142,9\pm 34,2\text{mg/kg}$ , equivalente a  $253,8\pm 74,8\text{mg/kg}^{0,75}$ . Assim, entre os tratamentos houve aumento aproximado de 17 vezes da ingestão de EPA+DHA. Nenhum animal apresentou alteração em seu quadro clínico que possa ser entendido como efeito colateral da ingestão de AGPI-3. Por não ser o objetivo do estudo, não foram realizadas nenhuma análise específica para investigação de possíveis efeitos colaterais (LENOX; BAUER, 2013).

A comparação da ingestão de EPA e DHA neste estudo com os achados de literatura não é simples, pois a definição da ingestão exata de EPA e DHA usado nas pesquisas, nas quais foram suplementados AGPI-3 para cães e avaliadas colesterolemia e trigliceridemia, não é explícita no material e métodos dos artigos publicados.

Tabela 3 – Ingestão diária média ( $\pm$  desvio padrão) de matéria seca, nutrientes e energia dos cães diabéticos (n=11) com alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).

Item (unidade/kg <sup>0,75</sup> )	Alimento C	Alimento A	Valor de p
Matéria seca (g)	27,50 $\pm$ 7,90	27,7 $\pm$ 8,5	0,89 <sup>§</sup>
Proteína bruta (g)	10,00 $\pm$ 2,80	10,2 $\pm$ 3,1	0,66 <sup>§</sup>
Amido (g)	5,2 $\pm$ 1,4	5,8 $\pm$ 1,8	0,09 <sup>§</sup>
Extrato etéreo (g)	4,5 $\pm$ 1,3	5,1 $\pm$ 1,5	0,04 <sup>§</sup>
Fibra bruta (g)	1,5 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 0,9	0,58 <sup>‡</sup>
Fibra dietética total (g)	8,1 $\pm$ 2,4	8,1 $\pm$ 2,5	0,95 <sup>§</sup>
Ômega-6 (mg)	1060,9 $\pm$ 333,6	977,1 $\pm$ 293,4	0,12 <sup>§</sup>
Ômega-3 (mg)	145,4 $\pm$ 48,5	419 $\pm$ 123,0	<0,01 <sup>§</sup>
EPA (mg)	7,2 $\pm$ 3,6	143,8 $\pm$ 42,3	<0,01 <sup>§</sup>
DHA (mg)	7,7 $\pm$ 3,7	110 $\pm$ 32,5	<0,01 <sup>§</sup>
Energia metabolizável (kcal)	111,2 $\pm$ 31,4	114,6 $\pm$ 32,3	0,27 <sup>§</sup>

Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: kg<sup>0,75</sup> = quilograma de peso metabólico. EPA=ácido eicosapentaenóico. DHA=ácido docosaexaenóico.

<sup>‡</sup>Valor de p obtido pelo teste de Wilcoxon; <sup>§</sup>Valor de p obtido pelo teste T pareado.

\*Diferença entre os tratamentos quando valor de p $\leq$ 0,05.

Em seu estudo, LeBlanc et al. (2005) usaram para comparação com dieta controle, em cães saudáveis, alimento com inclusão de 1,65% de óleo de peixe. Na análise do alimento os autores descreveram que o teste continha 6,95g de ômega-3/kg de alimento; 23,66g de ômega-6; 1,7g de EPA; 2,2g de DHA. Já o alimento controle continha, respectivamente: 1,67g/kg de alimento; 40,13g; menos de 0,1g de EPA; e 0,1g de DHA. Não ficou claro no estudo qual o consumo alimentar pelos cães nem qual a energia metabolizável dos alimentos. Com os dados disponibilizados é possível assumir que no estudo aqui apresentado com cães diabéticos, a inclusão de óleo de peixe foi três vezes maior que a do estudo de LeBlanc et al. (2005), com mesmo período de consumo (12 semanas).

Em animais saudáveis, foi encontrado estudo (ARAUJO et al., 2012) no qual os autores suplementaram 20 cães com duas cápsulas de ômega-3 por dia, por 30 dias. As 10 fêmeas tinham em média 7,9 $\pm$ 18,1kg e os machos 10,2 $\pm$ 22,3kg. Cada cápsula continha 221,83mg de EPA e 136,17mg de DHA, ou seja, os animais ingeriram diariamente 716,0mg de EPA+DHA. Com isso, pode-se extrapolar as informações e

dizer que a dose utilizada, em média, foi em torno de 79,1mg de EPA+DHA/kg. Apesar de ter padronizado a dieta dos cães, os autores não deixam claro se o alimento comercial utilizado continha AGPI-3 e as quantidades. Logo, a dose utilizada por Araujo et al. (2012) foi aproximadamente metade da utilizada neste estudo com cães diabéticos.

Por sua vez, Mazaki-Tovi et al. (2014), deixam claro em seu estudo que a dose média de EPA+DHA utilizada foi de 66mg/kg, fornecidos sob a forma de cápsulas. Entretanto, também não fica claro nesse estudo se houve a padronização dietética e quanto havia de AGPI-3 no alimento que os animais recebiam. Assim, a dose utilizada também fora em torno de 45,0% que a usada no presente estudo com cães diabéticos.

Especificamente com cadelas gestantes e seus filhotes, Wright-Rodgers et al. (2005) compararam os efeitos de quatro alimentos, com diferentes concentrações de ácidos graxos. Os autores não descreveram qual a inclusão do óleo de peixe na quantidade de alimento consumida pelos animais, o peso ou a necessidade energética das fêmeas durante a gestação nem dos filhotes até 12 semanas de vida, quando o estudo foi finalizado. Além de serem dietas isonutrientes, a única outra informação disponível quanto a composição nutricional foi o conteúdo de ácidos graxos expresso em gramas/100 gramas de ácidos graxos totais no alimento. Pôde-se notar que os alimentos variavam de 0,09 a 3,07g de DHA/100g de ácidos graxos; 0,09 a 2,83g de EPA; 7,5 a 39,3g de ômega-3; e 4,5 a 20,2g de ômega-6/100 gramas de ácidos graxos do alimento. Desta forma, a dose utilizada de EPA+DHA não pôde ser obtida.

Godoy et al. (2015; 2018) utilizaram dois alimentos, um sem e um com a inclusão de 2,0% de óleo de peixe, o que resultou em diferença na quantidade de ômega-3 total (0,24% na controle *versus* 0,86% na enriquecida, com base em matéria seca), ômega-6 total (3,47% vs. 2,21%), EPA (0,02% vs. 0,39%) e DHA (0,01% vs. 0,25%) nos alimentos. Apesar de ter fornecido a informação de como estimou a necessidade energética dos animais, a ausência de detalhes de consumo e peso dos cães impossibilitou o cálculo preciso da ingestão de EPA+DHA e a extrapolação de dose para fins comparativos com o presente estudo.

Em estudo mais recente encontrado sobre a suplementação de AGPI-3 para cães (COSTA-SANTOS et al., 2019), cadelas com carcinoma mamário receberam a partir do 15º dia pós procedimento de mastectomia e castração, 45mg de EPA+DHA/kg de peso corporal por 30 dias, seguido por 30mg/kg por 30 dias, sob a



forma de cápsulas. Ou seja, dose inferior a fornecida no estudo em questão e sem padronização da dieta dos animais.

O único estudo encontrado em que foi realizada a suplementação diretamente sob a forma líquida (BARROUIN-MELO et al., 2016), a dose utilizada foi de 0,2mL de óleo de peixe/kg de peso corporal, equivalente a 110mg de EPA+DHA/kg. Dose também inferior à usada neste estudo com cães diabéticos, porém semelhante ao outro único estudo encontrado com cães hiperlipidêmicos.

Com foco na hiperlipidemia, Albuquerque (2017) suplementou Schnauzers hiperlipidêmicos primários, com uma cápsula de óleo de peixe por animal dia, tanto quando recebiam sua alimentação habitual, como ao mudar a dieta para um alimento coadjuvante para obesidade. O peso dos animais e as características do óleo foram disponibilizados no artigo, de modo que foi possível obter a dose utilizada de 104,6mg de EPA+DHA/kg. Esta foi a maior dose encontrada em estudo com cães, cujo enfoque era hiperlipidemia, porém em torno de 25,0% menor que a utilizada neste estudo.

Para humanos, há pesquisas que apontaram ingestão média de 100mg de AGPI-3 por dia. Já alguns órgãos gerenciadores de medidas para melhorar a saúde recomendam 1000mg por semana para a prevenção de doenças crônicas, entre 250 e 1000mg por dia especificamente para prevenção de doenças coronarianas e entre 2,0 a 4,0g por dia para o controle da hiperlipidemia por hipertrigliceridemia (MOZAFFARIAN; RIMM, 2003, 2006a, 2006b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; LICHTENSTEIN et al., 2006; JENKINS et al., 2009).

Desta forma, este estudo utilizou a maior dose já testada, em comparação às encontradas na literatura, com aproximadamente o dobro da recomendada no tratamento de cães com hiperlipidemia que é a de 120mg EPA+DHA/kg<sup>0,75</sup> (BAUER, 2016). Nesta recomendação, não há referência ao estudo que originou a dosagem.

## 6.3 VARIÁVEIS LIPÍDICAS

### 6.3.1 CURVA DE TRIGLICERIDEMIA E COLESTEROLEMIA

Após o consumo de cada um dos dois alimentos utilizados no estudo, por 90 dias cada, sob mesma dose de insulina, com período de 30 dias de *washout* entre eles, foi avaliado o metabolismo lipídico dos cães diabéticos por meio de curva da

concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol, com seis pontos, iniciados antes da primeira refeição do dia e com intervalo de 2 horas entre eles.

Dentre as informações obtidas na curva de triglicerídeos, apesar de haver numericamente diferença entre os seis pontos da curva (Figura 3), nenhuma variável calculada apresentou diferença entre os dois períodos experimentais (Tabela 4).

Já para colesterolemia, foram observadas menores concentrações plasmáticas médias de colesterol em jejum e nos momentos duas, quatro e 10 horas pós-prandial (Figura 4 e Tabela 4), quando os nove cães diabéticos receberam o alimento enriquecido com 5,0% de óleo de peixe. A maior ingestão de AGPI-3 também parece ter repercutido na diminuição das concentrações médias, mínimas, máximas e na menor oscilação da colesterolemia ao longo do dia, por menor resultado na diferença entre valores máximos e mínimos de colesterolemia (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentrações plasmáticas médias ( $\pm$  desvio padrão) de triglicerídeos e colesterol de cães diabéticos (n=9) após a ingestão do alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).

Variáveis (mg/dL)	Triglicerídeos			Colesterol		
	Alimento C	Alimento A	p*	Alimento C	Alimento A	p*
T0	250,7 $\pm$ 230,4	164,4 $\pm$ 109,6	0,43 <sup>‡</sup>	297,3 $\pm$ 59,1	240,2 $\pm$ 49,7	<0,01 <sup>§</sup>
T2	309,5 $\pm$ 226,3	219,1 $\pm$ 104,5	0,18 <sup>§</sup>	278,5 $\pm$ 51,9	223,2 $\pm$ 53,7	<0,01 <sup>§</sup>
T4	305,8 $\pm$ 232,5	225,0 $\pm$ 124,1	0,65 <sup>‡</sup>	280,9 $\pm$ 43,8	231,8 $\pm$ 46,0	0,01 <sup>§</sup>
T6	220,5 $\pm$ 177,1	159,2 $\pm$ 141	0,57 <sup>‡</sup>	269,2 $\pm$ 52,8	234,1 $\pm$ 56,4	0,06 <sup>§</sup>
T8	160,7 $\pm$ 131,6	118,3 $\pm$ 84,7	0,57 <sup>‡</sup>	271,9 $\pm$ 42,6	239,0 $\pm$ 57,4	0,06 <sup>§</sup>
T10	130,0 $\pm$ 87,9	88,8 $\pm$ 31,4	0,13 <sup>‡</sup>	274,8 $\pm$ 49,4	236,9 $\pm$ 52,7	0,02 <sup>§</sup>
Média	229,5 $\pm$ 165,1	162,5 $\pm$ 77,4	0,25 <sup>§</sup>	278,8 $\pm$ 48,6	234,2 $\pm$ 52,0	0,01 <sup>§</sup>
Mínima	114,0 $\pm$ 77,3	81,0 $\pm$ 27,8	0,20 <sup>‡</sup>	260,6 $\pm$ 47,0	219,5 $\pm$ 50,5	0,02 <sup>§</sup>
Máxima	348,8 $\pm$ 237,6	261,4 $\pm$ 135,5	0,36 <sup>‡</sup>	301,8 $\pm$ 54,4	249,3 $\pm$ 55,7	0,01 <sup>§</sup>
$\Delta$	234,7 $\pm$ 187,1	180,4 $\pm$ 128,3	0,41 <sup>§</sup>	41,2 $\pm$ 13,3	29,8 $\pm$ 11,4	0,03 <sup>§</sup>
AAC	2373,6 $\pm$ 1710,6	1696,5 $\pm$ 858,4	0,28 <sup>§</sup>	2373,6 $\pm$ 1710,6	2333,4 $\pm$ 523,0	0,95 <sup>§</sup>
Jejum <sup>¥</sup>	254,2 $\pm$ 210,0	158,7 $\pm$ 98,9	0,12 <sup>‡</sup>	350,6 $\pm$ 135,6	308,3 $\pm$ 162,8	0,03 <sup>‡</sup>

Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

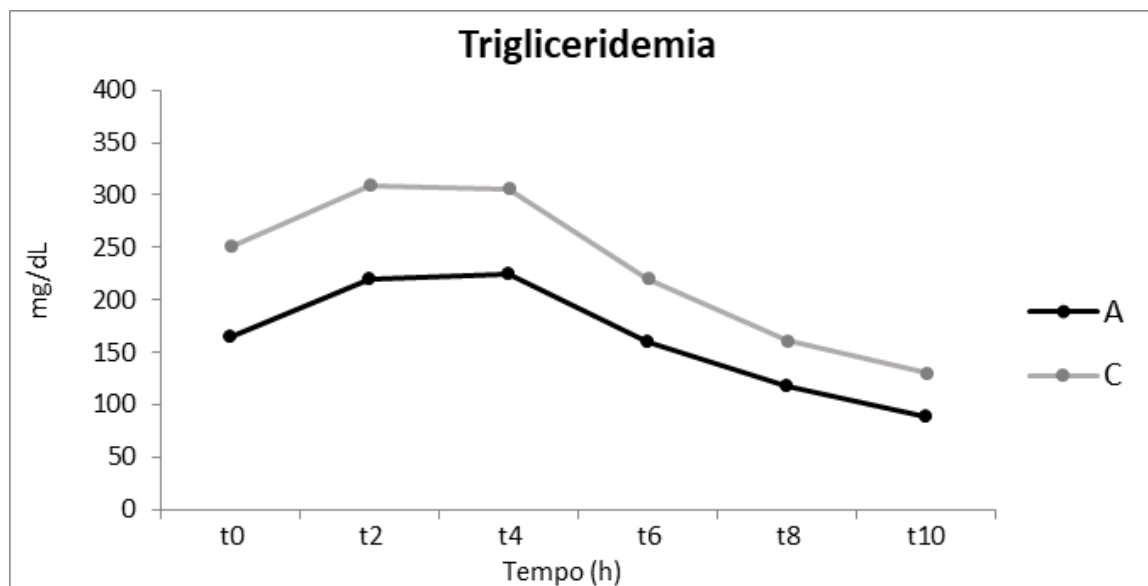
Legenda: AAC = área abaixo da curva;  $\Delta$  = diferença entre valores máximos e mínimos.

<sup>‡</sup>Valor de p obtido pelo teste de Wilcoxon; <sup>§</sup>Valor de p obtido pelo teste T pareado.

\*Diferença entre os tratamentos quando valor de  $p \leq 0,05$ .

<sup>¥</sup>Momento em jejum dos 11 animais que participaram do estudo, devido a inclusão dos dois cães que não aceitaram alimentação no hospital veterinário e não participaram das avaliações pós-prandiais.

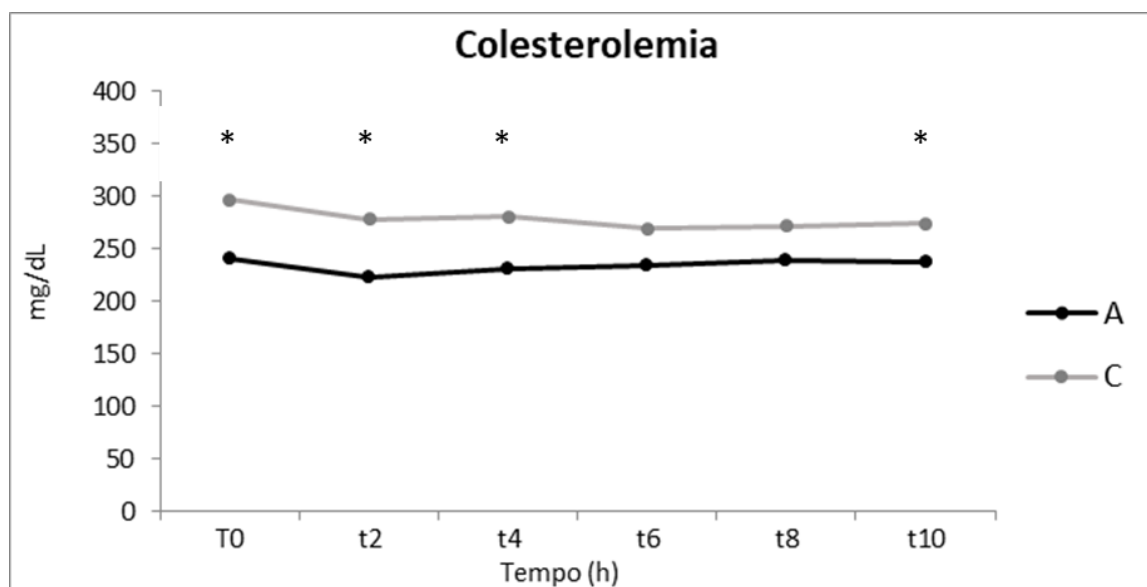
Figura 3 – Curvas de trigliceridemias médias de cães diabéticos (n = 9) após ingestão do alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).



Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: Linha cinza correspondente às mensurações pós alimento C (sem inclusão de óleo de peixe), e preta às mensurações pós alimento A (inclusão de 5,0% de óleo de peixe).

Figura 4 – Curvas de colesterolemias médias de cães diabéticos (n=9) após ingestão do alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).



Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: Linha cinza correspondente às mensurações pós alimento C (sem inclusão de óleo de peixe), e preta às mensurações pós alimento A (inclusão de 5,0% de óleo de peixe).

\*Correspondem a médias diferentes segundo o teste T pareado ( $p \leq 0,05$ ).

O primeiro estudo encontrado que comparou a colesterolemia de cães suplementados com ômega-3 e com grupo não suplementado teve como foco avaliar

os efeitos destes ácidos graxos nos cães após a indução de doenças cardiovasculares. Naquele estudo, os dois grupos de cães foram submetidos a dieta com 2,0% de colesterol por sete semanas. O grupo suplementado com 1,8 grama de EPA por dia apresentou numericamente menor aumento na colesterolemia do que o grupo que não consumiu EPA, porém, sem diferença neste aumento e na comparação entre os grupos no final das sete semanas (LANDYMORE et al., 1985). Nesta pesquisa, os autores também não deixaram claro o peso dos animais, o que impossibilita o cálculo da dose de EPA utilizado.

Araújo et al. (2012) observaram diferença na concentração sérica de colesterol após a suplementação de cães saudáveis com aproximadamente 79,1mg de EPA+DHA/kg, tanto nos machos como nas fêmeas avaliadas, enquanto os triglicerídeos reduziram apenas nas fêmeas após a suplementação. Naquele trabalho, todos os animais mantiveram os valores de trigliceridemia e colesterolemia dentro do intervalo de referência. E, apesar dos autores terem padronizado a dieta dos animais, não deixaram claro por quanto tempo eles a receberam e, por se tratar de um alimento com baixo conteúdo de gordura (5,0%), relativamente alto em fibras (6,5%) e com densidade energética baixa (3300 kcal/kg de alimento), os efeitos hipolipemiantes encontrados poderiam estar associados a dieta em si e não necessariamente a suplementação com AGPI-3, além dos autores não terem descrito quanto havia de AGPI-3 no alimento comercial que os cães receberam, uma vez que isso faria com que a dose recebida fosse maior que o ingerido apenas com a cápsula.

A importância da padronização da dieta foi questionada por Mazaki-tovi et al. (2014) em seu estudo. A baixa dose fornecida de AGPI-3 aos cães saudáveis foi atribuída pelos autores como um dos possíveis motivos para não ter ocorrido efeito da suplementação nas concentrações sanguíneas de triglicerídeos e colesterol dos cães saudáveis. Porém, os autores utilizaram 66,0mg de EPA+DHA/kg de peso corporal, dose aproximadamente 17,0% menor que a possivelmente utilizada por Araújo et al. (2012) que encontraram efeito hipolipemiante, com mesmo número de animais (n=20) e mesmo período de suplementação (30 dias). Uma importante diferença entre os estudos está na padronização da dieta. Mazaki-Tovi et al. (2014) questionaram se o fato dos cães participantes do seu estudo terem recebido diferentes alimentos, inclusive com diferentes concentração de AGPI-3, não poderia explicar o fato de não terem encontrado efeito da suplementação de ômega-3 sob a lipidemia dos cães.

Também sem padronizar a dieta fornecida, Costa-Santos et al. (2019) não encontraram efeito da suplementação de AGPI-3, para cadelas com neoplasias mamária, nas concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol. Da mesma forma, Barrouin-Melo et al. (2016) não observaram modificação no perfil lipídico dos cães com osteoartrite, suplementado com óleo de peixe sob a forma líquida. Apesar daqueles autores não terem padronizado a dieta dos cães, afirmaram que todos os alimentos consumidos pelos animais continham mesmo perfil nutricional, sem inclusão de fontes de AGPI-3.

Na pesquisa aqui apresentada, optou-se por realizar a inclusão do óleo de peixe diretamente no momento de produção do alimento comercial seco extrusado que os cães receberiam, e a análise do perfil nutricional diretamente no alimento, como forma de garantir a ingestão destes nutrientes de maneira isolada, minimizando os vieses, principalmente por se tratar de animais que são manejados por seus proprietários, o que sempre permite a dúvida de adequada adesão ao protocolo experimental instituído.

Em estudo mais recente com cães saudáveis (DE GODOY; MCLEOD; HARMON, 2018), também foi realizada a inclusão de óleo de peixe diretamente na produção do alimento. Assim como nos cães diabéticos, os autores encontraram apenas menor concentração de colesterol nos cães que receberam o alimento com 2,0% de inclusão do óleo, também sem modificação na trigliceridemia. Apesar de terem avaliado em cães saudáveis, os animais apresentavam sobrepeso (ECC 7/9), há no mínimo um ano, que foi induzido por consumo de alimento hipercalórico. Os autores não expuseram a informação se houve mudança nas concentrações de triglicerídeos e colesterol dos animais antes e após o ganho de peso, o que seria interessante para facilitar a extrapolação dos resultados como auxiliar no controle do aumento de frações lipídicas sanguíneas observada em cães obesos (JERICÓ et al., 2009; BRUNETTO et al., 2011; USUI; YASUDA; KOKETSU, 2015). No estudo em questão, com cães diabéticos, padronizou-se a inclusão apenas dos animais com no máximo ECC 6/9 (LAFLAMME, 1997) para evitar interferência do acúmulo de tecido adiposo nas variáveis avaliadas. Foi sugerido por estudo prévio que cães com sobrepeso podem apresentar resistência insulínica e isso poderia modificar a resposta metabólica dos cães a suplementação de AGPI-3. Porém, isso seria minimizado pelo delineamento *cross-over*, em que cada animal é o controle dele mesmo.

Anteriormente, o mesmo grupo realizou pesquisa semelhante com cães jovens saudáveis (DE GODOY et al., 2015). Quando os animais receberam alimento também com 2,0% de inclusão de óleo de peixe, os autores encontraram o que chamaram de tendência a menor colesterolemia e, diferente do esperado, maior concentração de triglicerídeos quando os cães ingeriram mais AGPI-3. Esse segundo achado foi atribuído pelos autores à maior trigliceridemia dos cães no início do estudo, mas sem hiperlipidemia.

Os efeitos mais evidentes de hipocolesterolemia do óleo de peixe também ocorreram em cadelas durante período reprodutivo e nos respectivos filhotes. Wright-Rodgers et al. (2005) compararam quatro dietas, com concentrações variáveis de EPA, DHA e outros ácidos graxos e encontraram concentrações plasmáticas de colesterol menores nas fêmeas que receberam alimento com mais EPA e DHA durante a gestação e lactação. Além disso, os filhotes nascidos dessas mães também apresentaram menor colesterolemia. Já em relação à concentração de triglicerídeos, essa foi maior nos filhotes que receberam o alimento com menor inclusão de óleo de peixe. Entretanto, os autores questionam se esses resultados, principalmente o aumento na trigliceridemia, poderiam ser atribuídos a presença de menor inclusão de AGPI-3 ou aos diferentes perfis de saturação da dieta e concentrações de outros ácidos graxos que não EPA e DHA. Neste estudo com cães diabéticos, houve variação no perfil de ácidos graxos dietéticos, principalmente com maior quantidade no alimento A daqueles da série ômega-3 em comparação ao alimento C (Tabela 2).

O único estudo encontrado que observou apenas modificação da trigliceridemia, sem efeito da suplementação de AGPI-3 na colesterolemia foi o de LeBlanc et al. (2005), que utilizou 15 animais divididos em três tratamentos (controle; inclusão de 1,6% de óleo de peixe; e 1,6% de óleo de peixe + vitamina E), dos quais os cães que receberam apenas suplementação de AGPI-3 tiveram redução da concentração sérica de triglicerídeos.

Com animais hiperlipidêmicos, foi encontrado apenas um estudo com foco na avaliação da possibilidade de minimização da hiperlipidemia com a suplementação de AGPI-3. No estudo foram utilizados Schnauzers com hiperlipidemia primária, os quais apresentaram redução tanto de triglicerídeos como de colesterol após a suplementação com cápsulas de óleo de peixe, que totalizaram ingestão média de 104,6mg de EPA+DHA/kg de peso corporal, tanto no grupo de cães que tiveram sua

dieta padronizada com alimento hipocalórico de alta fibra e baixa gordura, como dentre os animais que mantiveram sua alimentação habitual (ALBUQUERQUE, 2017).

Assim, o estudo em questão, com cães diabéticos, foi o primeiro a avaliar os efeitos da inclusão de óleo de peixe na dieta de cães endocrinopatas, o que resultou na possibilidade de indicação desta suplementação para os animais que necessitem de suporte para controle da hipercolesterolemia.

No contexto de investigação da relação entre AGPI-3 e modificações no metabolismo do colesterol, foi encontrado apenas um estudo com pesquisa aprofundada em cães (ONTSOUKA et al., 2010). Os autores forneceram dieta suplementada com AGPI-3 a cães com enteropatias crônicas e avaliaram a expressão de algumas proteínas da membrana do enterócito, relacionadas com a homeostase do colesterol, no intestino desses animais. Os cães diagnosticados com doença inflamatória intestinal, provavelmente a classificada atualmente como diarreia responsiva a imunossupressor (DANDRIEUX, 2016), apresentaram menor concentração de RNA mensageiro da caveolina-1, ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter*) e SREBP-2 (*sterol response element binding protein-2*), além de normalização da concentração de RNA mensageiro da NPC1L1. Estas proteínas atuam na mobilização dos estoques intracelulares de colesterol por terem alta afinidade para ligação com este lipídio, mediam o seu efluxo para lipoproteínas de alta densidade, regulam a síntese endógena de colesterol de acordo com a concentração deste lipídio em determinados ambientes orgânicos, o removerem de compartimentos endossomais nas células e facilitam o seu transporte para o complexo de Golgi ou carreadoras vesiculares (SIMONS; IKONEN, 2000; LEVY et al., 2007). Apesar de seu caráter preliminar e alguns vieses inerentes a metodologia utilizada, os autores deste estudo mostraram possível interferência dos AGPI-3 nas proteínas da membrana celular do enterócito (ONTSOUKA et al., 2010), fundamentais para que ocorra a absorção do colesterol intestinal (LEVY et al., 2007). Em outra pesquisa em cães com DM induzida, os autores mostraram relação importante da colesteroidogênese intestinal como causa da hipercolesterolemia dos cães diabéticos (KWONG et al., 1991). Logo, a atuação dos AGPI-3 com estas proteínas poderia justificar a minimização da colesterolemia dos pacientes caninos diabéticos. Além disso, essa interação do ômega-3 poderia ocorrer em outros tecidos no organismo canino e justificar modificações endógenas no metabolismo lipídico em outras situações clínicas, além das enteropatias crônicas.

### 6.3.2 LIPOPROTEÍNAS

Ao final do fornecimento de cada um dos alimentos utilizados no estudo (C e A), foi mensurado, por meio da metodologia FPLC, o perfil lipídico das lipoproteínas plasmáticas dos cães diabéticos.

Como pode ser observado na Tabela 5, as frações de VLDL dos cães diabéticos tiveram, em média, menores concentrações de colesterol após o período em que receberam o alimento com inclusão de 5,0% de óleo de peixe, tanto em valores absolutos (mg/dL) como na proporção (%) da distribuição de colesterol entre as lipoproteínas avaliadas. Na Figura 5 estão ilustradas as curvas médias de absorvâncias dos cães diabéticos obtidas pela metodologia FPLC.

Tabela 5 – Perfil lipídico médio ( $\pm$  desvio padrão) das lipoproteínas de cães diabéticos (n=11) após a ingestão do alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).

Variáveis	Alimento C	Alimento A	Valor de p
Colesterol total, mg/dL	350,7 $\pm$ 135,6	317,8 $\pm$ 162,5	0,07 <sup>§</sup>
VLDL-c,mg/dL	81,3 $\pm$ 105,5	34,5 $\pm$ 51,6	<0,01 <sup>‡</sup>
%	19,5 $\pm$ 14,8	8,5 $\pm$ 6,7	<0,01 <sup>‡</sup>
LDL-c,mg/dL	109,0 $\pm$ 62,6	116,2 $\pm$ 110,0	0,60 <sup>§</sup>
%	30,3 $\pm$ 14,9	32,4 $\pm$ 20,4	0,77 <sup>‡</sup>
HDL-c,mg/dL	160,4 $\pm$ 44,5	167,2 $\pm$ 66,8	0,47 <sup>‡</sup>
%	50,3 $\pm$ 17,7	59,1 $\pm$ 23,1	0,08 <sup>‡</sup>
não-HDL-c,mg/dL	190,3 $\pm$ 140,5	150,6 $\pm$ 153,8	0,05 <sup>‡</sup>
%	49,7 $\pm$ 17,7	40,9 $\pm$ 23,1	0,08 <sup>‡</sup>
Triglicerídeos totais, mg/dL	254,3 $\pm$ 209,9	166,7 $\pm$ 105,9	0,24 <sup>‡</sup>
VLDL-tg,mg/dL	175,0 $\pm$ 168,4	114,9 $\pm$ 94,6	0,41 <sup>‡</sup>
%	72,0 $\pm$ 21,6	65,5 $\pm$ 17,1	0,18 <sup>‡</sup>
LDL-tg,mg/dL	59,3 $\pm$ 94,1	32,9 $\pm$ 20,1	0,97 <sup>‡</sup>
%	20,7 $\pm$ 16,8	22,3 $\pm$ 11,0	0,53 <sup>‡</sup>
HDL-tg,mg/dL	20,0 $\pm$ 33,0	18,9 $\pm$ 24,9	0,22 <sup>‡</sup>
%	7,3 $\pm$ 5,9	12,2 $\pm$ 10,7	0,15 <sup>‡</sup>

Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: VLDL = *very low density lipoprotein*; LDL = *low density lipoprotein*; HDL = *high density lipoprotein*; -c = conteúdo de colesterol nas lipoproteínas; -tg = conteúdo de triglicerídeos nas lipoproteínas.

<sup>‡</sup>Diferença entre os tratamentos quando valor de  $p \leq 0,05$ .

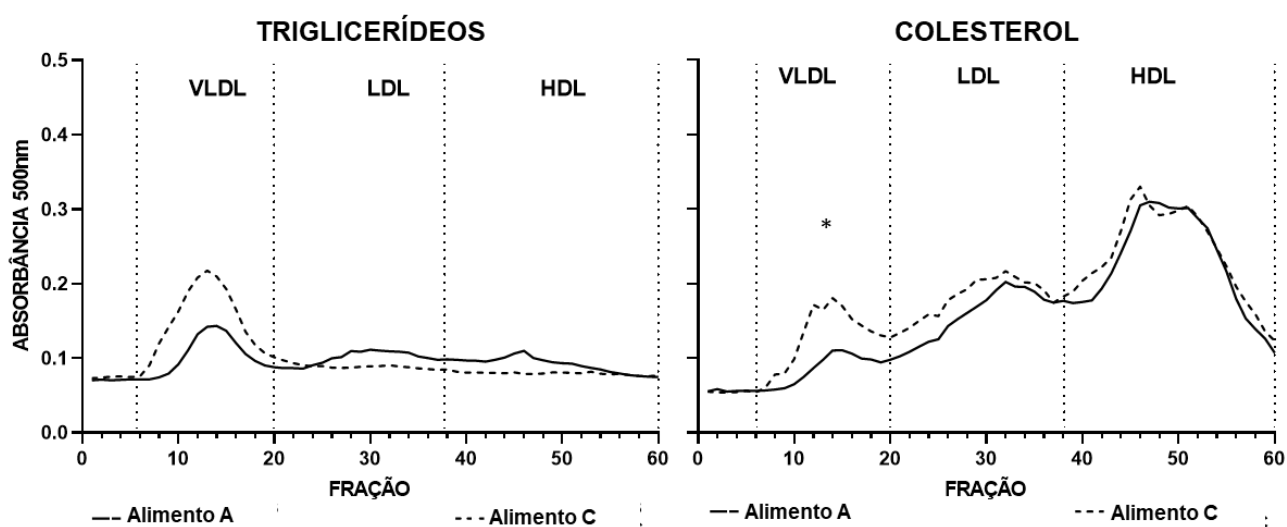
<sup>§</sup>Valor de p obtido pelo teste de Wilcoxon. <sup>§§</sup>Valor de p obtido pelo teste T pareado.

Quanto à distribuição de colesterol nas outras lipoproteínas e de triglicerídeos entre todas as lipoproteínas, não foi observada diferença entre os dois alimentos avaliados.



Quando se avalia as diferenças no perfil lipoproteico entre cães saudáveis e diabéticos, não há consenso entre os estudos, pois percebe-se que a hipercolesterolemia dos pacientes caninos diabéticos ocorreu tanto por maior acúmulo desse esterol nas partículas de VLDL e HDL, como por aumento distribuído entre todas as lipoproteínas avaliadas, principalmente LDL (ROGERS; DONOVAN; KOCIBA, 1975; WILSON et al., 1986; BARRIE et al., 1993; WHITNEY et al., 1993; SEAGE; DROBATZ; HESS, 2018). Porém, dentre os poucos estudos encontrados com DM naturalmente adquirido (WILSON et al., 1986; SEAGE; DROBATZ; HESS, 2018), os autores não padronizaram as dietas dos animais intra- e inter-grupos e os tempos prévios de jejum não são explícitos, o que pode ter alterado os resultados e tornado o assunto ainda menos conclusivo, mesmo em estudos com animais saudáveis.

Figura 5 – Distribuição média de triglicerídeos e colesterol de acordo com a absorbância das lipoproteínas de cães diabéticos (n=11) após a ingestão do alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).



Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: VLDL=lipoproteína de densidade muito baixa. LDL=lipoproteína de densidade baixa; HDL=lipoproteína de alta densidade.

\*Correspondem a médias diferentes segundo o teste de Wilcoxon ( $p < 0,01$ ).

Em cães saudáveis, foram encontrados apenas dois estudos que interviram com a suplementação de AGPI-3, principalmente EPA. Em ambos, os animais passaram por procedimento cirúrgico de indução de infarto no miocárdio e a avaliação lipoproteica foi um achado secundário ao objetivo central dos estudos. Cahill et al. (1988) suplementaram 2 gramas de EPA por dia, durante três meses aos cães e, em

comparação aos indivíduos não suplementados, não foi observada modificação na concentração e distribuição plasmática de colesterol entre as lipoproteínas. Da mesma forma, Casali et al. (1986) também não observaram diferença nestas variáveis entre cães que receberam alimento comercial completo e dieta a base de peixe, óleo de peixe e suplementação de vitaminas e minerais, apesar de ter observado mudança na concentração de ácidos graxos séricos dos cães: 0,1% de EPA no grupo controle e 25,0% no grupo suplementado. Neste estudo, os autores não deixaram claro o perfil nutricional das dietas utilizadas, o que poderia ajudar na interpretação dos resultados.

Em cadelas que foram submetidas a mastectomia e castração, foi encontrado um estudo no qual foi fornecida suplementação de AGPI-3, porém sem modificação no perfil lipoproteico dos animais (COSTA-SANTOS et al., 2019). Esse resultado poderia ser diferente caso a interpretação dos dados fosse associada a informação do perfil nutricional dos alimentos que os cães recebiam. Além disso, os autores comentaram que a dose de AGPI-3 utilizada (45mg de EPA+DHA/kg nos primeiros 30 dias de suplementação, seguida por 30mg/kg nos 30 dias seguintes) pode ser considerada baixa.

Na literatura, não foi encontrado nenhum estudo que tenha realizado intervenção dietética em cães diabéticos e posteriormente mensurado a distribuição da concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol entre as lipoproteínas. Diante da ausência de achados desta avaliação com cães hiperlipidêmicos, pode-se dizer que este é o primeiro estudo que avaliou o perfil lipoproteico de cães com hipertrigliceridemia e/ou hipercolesterolemia, secundárias a endocrinopatias, após a suplementação com AGPI-3.

O cálculo do não-HDL-c como ferramenta de avaliação do metabolismo lipídico de cães diabéticos fora usado previamente em outro estudo com cães diabéticos, o qual mostrou que o DM canino culmina em hipercolesterolemia principalmente por aumento do LDL-c e não-HDL-c (SEAGE; DROBATZ; HESS, 2018). No estudo aqui em questão, a suplementação de AGPI-3 fez com que a concentração de não-HDL-c diminuísse em relação ao momento que os cães ingeriram o alimento sem óleo de peixe ( $p=0,05$ ). Com base em estudos com humanos diabéticos, alguns autores afirmaram que o uso do não-HDL-c como marcador de metabolismo lipídico é interessante por ser um preditor importante de alterações relacionadas a doenças cardiovasculares e aterosclerose (COLE et al., 2013; BJORNSTAD et al., 2015).

Já os resultados da avaliação do perfil lipídico de humanos frente a suplementação com EPA e DHA ainda são controversos, com dificuldade de comparação e interpretação dos resultados devido a ampla variação de delineamentos experimentais e metodologias de análise dos lipídios plasmáticos, além de variação ou ausência de informação quanto a dosagem utilizada e formas de suplementação dos AGPI-3 e, dos perfis nutricionais dos indivíduos participantes das pesquisas (BAGDADE; RITTER; SUBBAIAH, 1996; HARRIS, 1997; MORI et al., 1999; FAKHRZADEH et al., 2010; JEPPESEN; SCHILLER; SCHULZE, 2013; TAGHIZADEH et al., 2016; CADARIO et al., 2019). Quando os estudos com suplementação de óleo de peixe para pacientes humanos com hiperlipidemia são compilados, sob a forma de meta-análises, há evidência de que o óleo de peixe atua na redução da concentração sanguínea de triglicerídeos, inclusive com relevância clínica, sem modificação na concentração de colesterol (ESLICK et al., 2009).

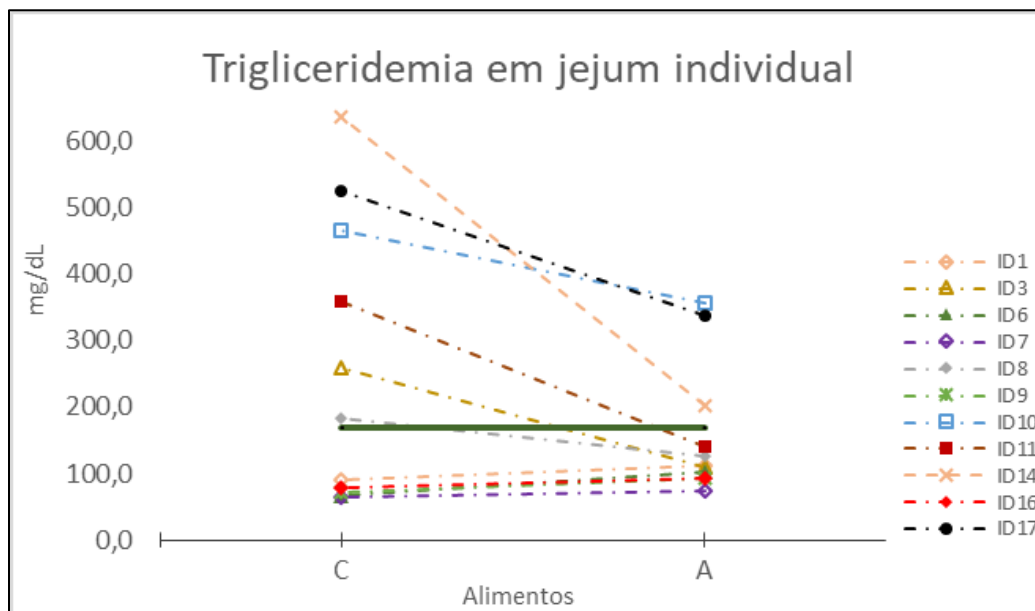
No quesito relevância clínica, pode-se observar que, quando se compara as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol em jejum dos 11 cães diabéticos do estudo em questão (pela inclusão dos cães que não aceitaram alimentação no HOVET-FMVZ/USP), em função das dietas, houve redução numérica na trigliceridemia de seis animais ( $n=6/11$ ), com diminuição média de 32,7% ao se considerar os 11 animais (Figura 6), porém sem diferença (Tabela 4;  $p=0,12$ ). Pode-se questionar que a ausência de diferença entre os momentos esteja relacionada ao fato de que os cinco cães que não apresentaram redução na trigliceridemia tiveram concentrações deste lipídio dentro do intervalo dos valores de referência (40 a 169mg/dL) nos dois períodos avaliados. Apesar de não terem diferido, esses dados mostram que pode haver relevância da suplementação de AGPI-3 para alguns animais e, caso o “n” amostral do estudo fosse maior, com mais animais hipertrigliceridêmicos, talvez houvesse maior poder do teste estatístico.

Em relação aos resultados de colesterolemia, a análise do momento em jejum dos 11 cães manteve a menor concentração dos animais após ingestão do alimento A do que do alimento C (Tabela 4) e a redução ocorreu em mais indivíduos ( $n=9/11$ ; Figura 7) do que para a trigliceridemia, porém com diminuição média de menor magnitude: 8,5%.

Essa ampla variação individual observada, principalmente nas variáveis relacionadas a curva de trigliceridemia, expressos como altos valores de desvio padrão, já foram observados em outros estudos (DE MARCO et al., 2017), inclusive

em cães diabéticos (FLEEMAN; RAND; MARKWELL, 2009). De Marco et al. (2017), encontraram variação na concentração sanguínea de triglicerídeos de 350 a 4356mg/dL. O motivo deste metabólito lipídico variar tanto entre indivíduos não foi encontrado na literatura, porém há a hipótese de que poderia ser uma resposta fisiológica individual a diferentes necessidades de insulina entre os pacientes caninos diabéticos ou estar relacionado a outras diferenças individuais já observadas como em marcadores inflamatórios e hormônios como a leptina (O'NEILL et al., 2012; KIM et al., 2015), o que precisaria de novos estudos para ser explicado.

Figura 6 – Concentrações de triglicerídeos plasmáticos de cães diabéticos (n=11) após ingestão de alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).



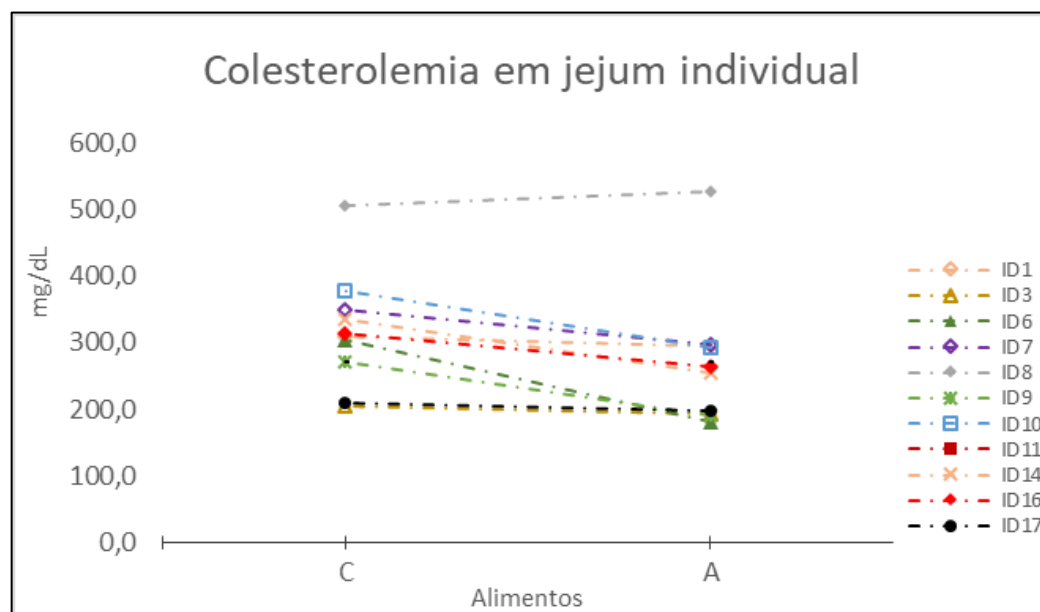
Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: ID=identificação dos animais incluídos no estudo. Linha contínua preta horizontal representa o limite superior do intervalo de valor de referência da trigliceridemia canina (40 a 169mg/dL), de acordo com o Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/HOVET-FMVZ/USP.

Há pouca informação disponível para a espécie canina quanto aos mecanismos de ação envolvidos no efeito hipolipemiante dos AGPI-3. Na tentativa de explicar tais aspectos, foram encontrados na literatura da medicina humana diversas possibilidades, que explicariam principalmente a redução na concentração sérica de triglicerídeos, como a menor indução à síntese de triglicerídeos e de VLDL hepática; menor secreção de VLDL hepática; maior estímulo à atividade da lipoproteína-lipase do endotélio vascular para maior captação de moléculas de triglicerídeos do

quilomícrom e VLDL, e conseqüente maior catabolismo lipídico (NESTEL et al., 1984; BAYS et al., 2008).

Figura 7 – Concentrações de colesterol plasmático de cães diabéticos (n=11) após ingestão do alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).



Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: ID=identificação dos animais incluídos no estudo. Linha contínua preta horizontal representa o limítrofe superior do intervalo de valor de referência da colesterolemia canina (125 a 270mg/dL), de acordo com o Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/HOVET-FMVZ/USP.

Entretanto, poucas avaliações foram realizadas em cães, e sabe-se que o metabolismo lipídico nesta espécie apresenta algumas particularidades (OUGUERRAM et al., 2004; XENOULIS; STEINER, 2010). Diversos autores já mostraram que há naturalmente menor atividade da CETP nos cães, a qual, em comparação a de humanos, varia de 1,0 a 27,0% (HAA; BARTER, 1982; CHEUNG; WOLFBAUER; ALBERS, 1996; GUYARD-DANGREMONT et al., 1998; TSUTSUMI; HAGI; INOUE, 2001). Isso faz com que o cão saudável mantenha menor concentração de LDL-c e maior de HDL-c (BAILHACHE et al., 2003; XENOULIS; STEINER, 2010).

Em humanos, alguns pesquisadores mostraram que quando há modificações na ação da insulina, como nos diabéticos insulín-dependentes (BAGDADE; RITTER; SUBBIAH, 1996), não-insulín-dependentes (BAGDADE et al., 1993) ou obesos com resistência insulínica (DULLAART et al., 1994), há maior atividade da CETP, o que justificaria o aumento do colesterol não-HDL nestas situações. Não foram encontrados na literatura estudos que provem que em cães diabéticos há aumento da atividade da

CETP, mas alguns autores que estudaram cães obesos com resistência insulínica defendem essa hipótese, visto que já encontraram resultados compatíveis a essa afirmação, como por exemplo o aumento de VLDL-c e HDL-tg, justificado pela transferência de colesterol da VLDL para a HDL por meio da troca por triglicerídeos (BAILHACHE et al., 2003).

A relação dos AGPI-3 com a atividade da CETP foi demonstrada por Bagdade et al. (1996), que após suplementar óleo de peixe a pessoas com DM insulínica, observou menor trigliceridemia desses indivíduos, redução para a normalidade da atividade de transferência de colesterol esterificado da HDL para lipoproteínas de menor densidade e aumento nas concentrações de CETP. O suposto aumento de atividade da CETP em indivíduos diabéticos sendo minimizado pelo ômega-3 justificaria os resultados lipoproteicos com cães diabéticos aqui apresentados, pois uma vez a CETP catalisando a transferência do colesterol esterificado da VLDL para a HDL, em troca de triglicerídeos (BAILHACHE et al., 2003; XENOULIS; STEINER, 2010), seria esperada diminuição do VLDL-c com aumento do HDL-c e do VLDL-tg. A primeira expectativa foi cumprida neste estudo, uma vez que houve diminuição da VLDL-c absoluta e relativa ( $p < 0,01$ ) e da não-HDL-c ( $p = 0,05$ ) dos cães com DM após receberem EPA+DHA em comparação ao período sob alimento controle. Já o aumento de HDL-c após alimentação com AGPI-3 não foi observado, porém se considerarmos valor de  $p < 0,10$  como tendência a diferença, podemos observar possível aumento ( $p = 0,08$ ) nos valores de HDL-c relativos e à diminuição do não-HDL-c relativo. Talvez a alteração de VLDL-tg aconteceria se houvessem mais animais hiperlipidêmicos do que na amostra populacional aqui utilizada.

Apesar desta teoria, pesquisadores que forneceram suplementação de ácido nicotínico a cães obesos com resistência insulínica aventaram a hipótese que esta suplementação estimularia modificação no perfil de lipoproteínas independente da atividade da CETP (LE BLOC'H et al., 2015). A relação da redução da colesterolemia com a suplementação de AGPI-3, sem associação com a atividade do transporte reverso do colesterol foi sugerida em um estudo, no qual os pesquisadores observaram maior excreção biliar de colesterol em ratos que ingeriram dieta com inclusão de óleo de peixe (MORGADO; RIGOTTI; VALENZUELA, 2005), mas sem dados em cães.

Assim, mais estudos são necessários para o entendimento do(s) mecanismo(s) de modificação do metabolismo lipídico em cães diabéticos, promovido pelos AGPI-3,

bem como para o entendimento das alterações que as endocrinopatias causam nos cães.

#### 6.4 ESVAZIAMENTO DA VESÍCULA BILIAR

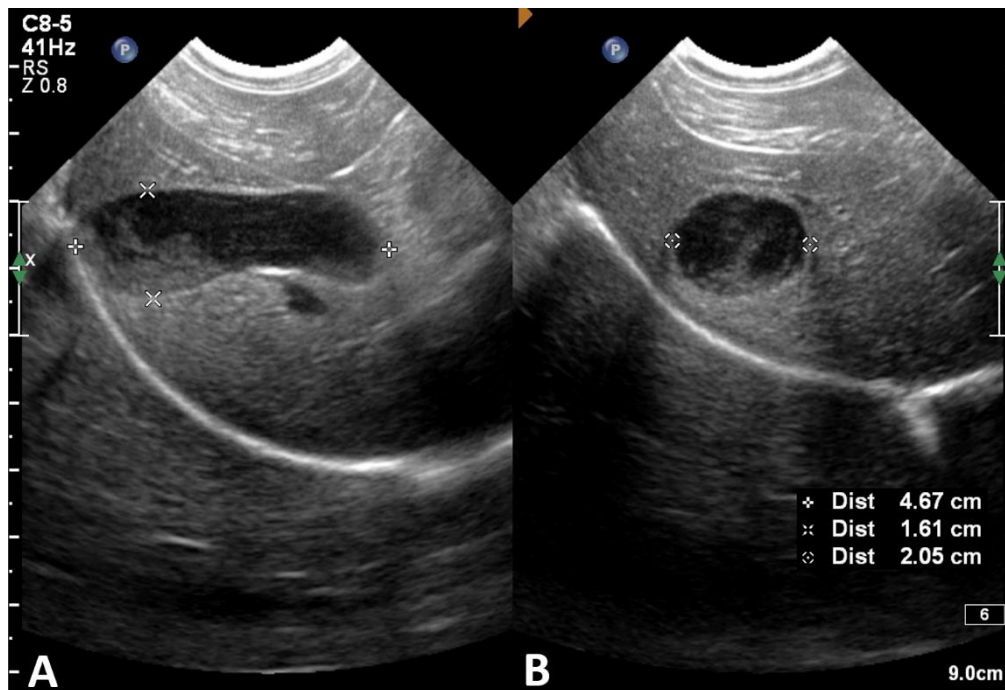
Cães com hiperlipidemia parecem ter maior risco de desenvolvimento de doenças emergentes da vesícula biliar, como a colelitíase e mucocele (XENOULIS, 2014; YOUN et al., 2018). Especificamente a hipercolesterolemia aumentou 2,92 vezes o risco para desenvolvimento da mucocele de vesícula biliar e 9,72 vezes para colelitíase. Já os cães com hipertrigliceridemia apresentaram risco de 3,55 para mucocele e 12,91 para colelitíase (KUTSUNAI et al., 2014; LEE; KWEON; KIM, 2017).

As endocrinopatias, além de serem possíveis causas de hiperlipidemia, alteram a viscosidade da bile (COOK; JAMBHEKAR; DYLEWSKI, 2016), o metabolismo dos ácidos biliares (O'KELL et al., 2017; JERGENS et al., 2019) e predispõem à mucocele de vesícula biliar (MESICH et al., 2009; LEE; KWEON; KIM, 2017; AICHER et al., 2019).

Assim, como a bile é uma importante via de excreção do colesterol (PERTSEMLIDIS; KIRCHMAN; AHRENS, 1973), julgou-se importante estudar a vesícula biliar como parte da adequada avaliação do metabolismo lipídico dos cães diabéticos, com a hipótese de que a suplementação de AGPI-3 poderia minimizar a hiperlipidemia e, uma das possíveis explicações, seria o aumento da excreção de colesterol por esta via. Para isso, foi definida a fração de ejeção de bile e o volume biliar dos cães após 90 dias de ingestão dos alimentos controle (C, sem óleo de peixe) e teste (A, com 5,0% de inclusão de óleo de peixe). Tais variáveis foram avaliadas por meio de ultrassonografias da vesícula biliar, com mensuração do comprimento máximo e altura máxima no corte longitudinal (Figura 8A) e da largura máxima no corte transversal (Figura 8B) (TSUKAGOSHI et al., 2012).

Como pode ser observado na Tabela 6, não foi encontrada nenhuma diferença entre os volumes biliares médios e entre as frações de ejeção biliares médias dos cães diabéticos quando receberam o alimento A ou alimento C.

Figura 8 – Imagem ultrassonográfica da vesícula biliar de cão diabético como exemplo das mensurações efetuadas no estudo. A) Comprimento e altura no corte longitudinal. B) Largura no corte transversal.



Fonte: Serviço de Diagnóstico por Imagem, FMVZ/USP (2020). Adaptado por Teixeira, F.A. (2020).

Na literatura foi encontrado um caso relatado de cão com mucocele de vesícula biliar ao qual foi instituído como parte do tratamento a suplementação com óleo de peixe (WALTER et al., 2008). Não foram encontrados estudos que tenham avaliado o real efeito dos AGPI-3 na vesícula biliar de cães. Porém, quando são usadas outras espécies como modelo de estudo para doenças da vesícula biliar, principalmente colelitíase, são encontrados experimentos nos quais os autores observaram menor saturação de colesterol biliar, nucleação e frequência de colelitíase; concentração de ácido araquidônico (relacionado com processo inflamatório e ocorrência de litíase biliar); produção de prostaglandinas na vesícula biliar; e mais colesterol e AGPI-3 nos fosfolípidios da bile em ratos (MORGADO; RIGOTTI; VALENZUELA, 2005), macacos (SCOBEY et al., 1991), hamsters (MIZUGUCHI et al., 1997) e cães-da-pradaria (*Cynomys ludovicianus*) (BOOKER; SCOTT; LA MORTE, 1990; MAGNUSON et al., 1995). Os fosfolípidios com AGPI-3 por serem menos hidrofóbicos, facilitariam a excreção e fluidez da bile (SCOBEY et al., 1991).



Tabela 6 – Volume e fração de ejeção biliar médios ( $\pm$  desvio padrão) de cães diabéticos (n=9) após ingestão de alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).

Momento (minutos)	Volume biliar (mL/kg)			Fração de ejeção (%)		
	Alimento C	Alimento A	p*	Alimento C	Alimento A	p*
0	1,3 $\pm$ 1,0	1,3 $\pm$ 1,0	0,79 <sup>§</sup>	-	-	-
30	1,2 $\pm$ 1,0	1,3 $\pm$ 1,1	0,06 <sup>‡</sup>	11,4 $\pm$ 21,8	-6,6 $\pm$ 23,1	0,06 <sup>‡</sup>
60	1,2 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 0,8	0,45 <sup>‡</sup>	9,8 $\pm$ 28,2	15 $\pm$ 13,9	0,65 <sup>‡</sup>
120	1,1 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 1,0	0,87 <sup>‡</sup>	15,5 $\pm$ 23,0	16,1 $\pm$ 31,0	0,82 <sup>‡</sup>

Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: <sup>‡</sup>Valor de p obtido pelo teste de Wilcoxon; <sup>§</sup>Valor de p obtido pelo teste T pareado.

<sup>\*</sup>Diferença entre os tratamentos quando valor de  $p \leq 0,05$ .

Tais efeitos justificariam a diminuição da colesterolemia encontrada nos cães diabéticos suplementados com óleo de peixe, porém parece não ter afetado a fluidez da bile dos cães deste estudo. É importante apontar que a mudança na fluidez poderia ter sido prejudicada pela maior ingestão de gordura que ocorreu nos animais quando receberam o alimento com mais AGPI-3 (Tabela 3). Neste contexto, foi encontrado em um único estudo (KAKIMOTO et al., 2017) a comparação do efeito, na vesícula biliar canina, de um alimento chamado “alta gordura” (20,0% de gordura e 8,0% de colesterol) *versus* “baixa gordura” (sem a informação da quantidade no alimento). Após o recebimento do alimento “alta gordura” houve aumento da colesterolemia, modificações do perfil de ácidos biliares, com destaque para a maior concentração de ácidos citotóxicos e diminuição de citoprotetores e, no teste de indução da motilidade da vesícula biliar com infusão de colecistoquinina, observou-se menor esvaziamento da mesma. Os autores concluíram que a maior quantidade de gordura na dieta, inclusive colesterol, causou estes resultados devido ao maior grau de citotoxicidade biliar, mais ácidos biliares hidrofóbicos na bile e possível menor sensibilidade da vesícula biliar à colecistoquinina, como já fora relatado em outras espécies (BEHAR et al., 2013). Porém, este estudo com cães (KAKIMOTO et al., 2017) não fornece detalhes sobre o perfil nutricional dos alimentos, como a quantidade exata de extrato etéreo e o conteúdo de AGPI-3.

No estudo com cães diabéticos, para a melhor avaliação dos efeitos da suplementação de ômega-3 no metabolismo lipídico e na vesícula biliar, outras avaliações poderiam ter sido realizadas, como a mensuração do perfil e concentração de fosfolipídios e colesterol biliar, porém exigiria intervenção muito invasiva para a coleta do material biológico.

Vale ressaltar que um viés importante destas variáveis do estudo é o fato de não ter sido sempre o mesmo operador ultrassonográfico. Porém, este viés pode ter sido minimizado pelo fato de todos os operadores apresentarem importante experiência ultrassonográfica e terem passado por treinamento com a pessoa mais experiente da equipe neste assunto.

## 6.5 AVALIAÇÃO GLICÊMICA

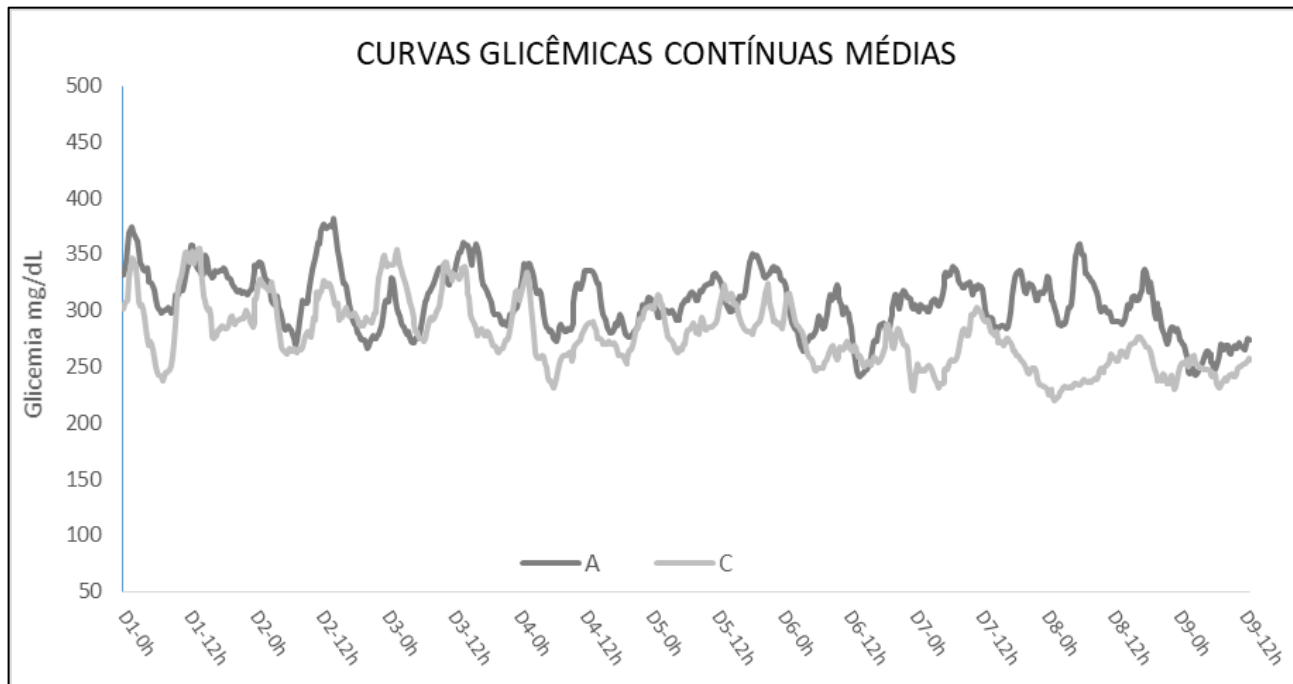
Na tentativa de testar a hipótese de que a suplementação com AGPI-3 na dieta de cães diabéticos culminaria na minimização da glicemia desses animais, foram utilizadas duas metodologias de mensuração glicêmica em 11 cães diabéticos após receberem o alimento sem óleo de peixe e o com a inclusão de 5,0% deste ingrediente. No 75º dia de cada período experimental, foi implantado nos animais o SCMG, e no 90º dia foi realizada a curva glicêmica convencional de 10 horas.

### 6.5.1 VARIÁVEIS GLICÊMICAS CONTÍNUAS

Apesar do uso do SMCG Freestyle Libre possibilitar a obtenção de curva glicêmica por 15 dias (20.160 minutos), como alguns animais removeram o sensor de glicemia antes disso, foi utilizado como balizador para igualar o mesmo período de avaliação nos 11 cães diabéticos, aquele que ficou menos tempo com o SMCG funcionando. Como o menor período de monitoração glicêmica foi de oito dias no animal ID 9 - alimento C, que registrou a concentração de glicose intersticial até o minuto 12.780, padronizou-se que nas 22 curvas glicêmicas contínuas obtidas seriam utilizados do minuto 0 (cinco mensurações glicêmicas – uma hora – antes da primeira refeição do dia) até o minuto 12.300, equivalente a oito dias completos e um período diurno completo, finalizado pelo momento da segunda refeição diária.

Com base nestas curvas glicêmicas foram obtidas as curvas médias dos animais, separadas pelo período de oferta de cada um dos dois alimentos utilizados no estudo (Figura 9).

Figura 9 – Concentração intersticial média de glicose obtida pelo sistema de mensuração contínua de cães diabéticos (n=11) após ingestão do alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).



Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: Linha cinza correspondente às mensurações pós alimento C (sem inclusão de óleo de peixe), e preta às mensurações pós alimento A (inclusão de 5,0% de óleo de peixe).

Com base nas curvas glicêmicas, obtiveram-se as variáveis disponíveis na Tabela 7, na qual pode-se observar que quando os animais receberam o alimento A, com inclusão de 5,0% de óleo de peixe, houve maiores valores das variáveis glicemia média total ( $p=0,04$ ); glicemia média noturna ( $p=0,02$ ); glicemia máxima diurna ( $p=0,01$ ); glicemia máxima noturna ( $p<0,01$ ); tempo médio em hipoglicemia ( $p<0,01$ ) e tempo médio em hiperglicemia ( $p<0,01$ ); o que contradiz a hipótese inicialmente estabelecida.

Não foi encontrado nenhum estudo que tenha avaliado a resposta glicêmica de cães com DM após suplementação com AGPI-3, o que torna esta pesquisa inédita. Em cães saudáveis, foram encontrados alguns dados na literatura. Inicialmente Irvine et al. (2002), incluíram 1,4g de EPA+DHA/kg de alimento para um grupo de seis labradores saudáveis, não obesos. Apesar de ter obtido mudança no perfil de ácidos graxos, com mais EPA e DHA na membrana celular das hemácias, os autores não observaram mudança nos marcadores de sensibilidade à insulina avaliados na pesquisa. Os mesmos questionaram se estes cães apresentassem algum grau de sobrepeso que resultasse em resistência à insulina, a suplementação de AGPI-3 teria

melhorado essa resistência, uma vez que um dos labradores, que apresentou menor sensibilidade à insulina antes da suplementação, obteve melhoria após ingestão da dieta com ômega-3.

Tabela 7 – Variáveis glicêmicas contínuas médias ( $\pm$  desvio padrão) de cães diabéticos (n=11) após ingestão do alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).

Variáveis	Alimento C	Alimento A	Valor de p*
Glicemia média total (mg/dL)	276,2 $\pm$ 64,6	308,4 $\pm$ 64,9	0,04 <sup>§</sup>
Glicemia média diurna (mg/dL)	275,7 $\pm$ 63,7	306,0 $\pm$ 65,7	0,09 <sup>§</sup>
Glicemia média noturna (mg/dL)	277,5 $\pm$ 71,8	312,8 $\pm$ 69,7	0,02 <sup>§</sup>
Glicemia em jejum diurno (mg/dL)	302,4 $\pm$ 60,7	319,4 $\pm$ 63,6	0,51 <sup>§</sup>
Glicemia em jejum noturno (mg/dL)	290,8 $\pm$ 64,1	321,0 $\pm$ 62,1	0,14 <sup>§</sup>
Glicemia máxima diurna (mg/dL)	371,7 $\pm$ 47,7	411,5 $\pm$ 48,8	0,01 <sup>§</sup>
Glicemia máxima noturna (mg/dL)	373,7 $\pm$ 67,9	415,0 $\pm$ 58,9	<0,01 <sup>§</sup>
Glicemia mínima diurna (mg/dL)	197,1 $\pm$ 66,6	214,4 $\pm$ 77,9	0,77 <sup>†</sup>
Glicemia mínima noturna (mg/dL)	205,2 $\pm$ 76,9	226,3 $\pm$ 79,6	0,25 <sup>§</sup>
$\Delta$ diurno (mg/dL)	174,7 $\pm$ 60,4	197,1 $\pm$ 64,8	0,20 <sup>§</sup>
$\Delta$ noturno (mg/dL)	168,5 $\pm$ 78,8	188,7 $\pm$ 77,0	0,41 <sup>†</sup>
Área abaixo da curva	227974,3 $\pm$ 53917,5	252171,4 $\pm$ 53737,9	0,07 <sup>§</sup>
Tempo médio em hipoglicemia (%) <sup>†</sup>	4,7	1,3	<0,01 <sup>€</sup>
Tempo médio em hiperglicemia (%) <sup>†</sup>	40,4	53,1	<0,01 <sup>€</sup>

Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda:  $\Delta$  = diferença entre valores máximos e mínimos.

<sup>†</sup>Representam proporções, portanto não se aplica o conceito de desvio padrão.

\*Diferença entre os tratamentos quando valor de  $p \leq 0,05$ .

Valor de p obtido pelo <sup>†</sup>teste de Wilcoxon, <sup>§</sup>T pareado ou <sup>€</sup>qui-quadrado para comparação entre proporções.

Esse questionamento foi em parte testado por de Godoy et al. (2018) que forneceram a cães em sobrepeso (ECC 7/9) alimento com inclusão de 2,0% de óleo de peixe e, após realizarem teste intravenoso de tolerância à glicose, não obtiveram modificação na resposta glicêmica desses animais, em comparação aos mesmos quando receberam o alimento controle sem a inclusão de óleo de peixe. Previamente, estudo semelhante fora realizado pela mesma equipe de pesquisa, com animais jovens e, também, não foi observada mudança na resposta glicêmica destes animais. Da mesma forma, Barrouin-Melo et al. (2016), avaliaram cães com osteoartrite e não perceberam mudança na glicemia dos animais antes e após a suplementação com 110mg de EPA+DHA/kg de peso corporal por 16 semanas.

Entretanto, no estudo mais recente encontrado, Costa-Santos et al. (2019) observaram que ao suplementar entre 30 e 45,0mg de EPA+DHA/kg de peso corporal

a cadelas submetidas a mastectomia, devido a ocorrência de carcinoma mamário, a glicemia desses animais apresentou evidências de aumento. Porém, a comparação feita pelos autores foi entre o momento pré-cirúrgico e o momento pós suplementação, que foi iniciada 15 dias após a cirurgia. Assim, não fica claro se a intervenção cirúrgica em si poderia ter interferido na glicemia dos animais.

Desta forma, dentre os poucos estudos que avaliaram o efeito dos AGPI-3 nas variáveis do metabolismo glicídico canino, a única mudança observada condiz com os dados aqui apresentados dos cães diabéticos, que parecem ter apresentado piora dos marcadores glicêmicos oriundos do SMCG.

Ao extrapolar-se a busca para humanos e animais de laboratório, foram encontrados estudos com pessoas diabéticas, tanto tipo 1 como tipo 2, obesas com resistência insulínica, e roedores com DM induzido. Os resultados divergem, tanto para melhora como piora do controle glicêmico (KASIM et al., 1988; FRIDAY et al., 1989; FRIEDBERG et al., 1998; HARTWEG et al., 2008; BI et al., 2017).

Na tentativa de entender como os AGPI-3 atuariam no controle glicêmico, Cormier et al. (2013), após perceberem em estudo prévio que a suplementação de óleo de peixe para pessoas (3,0 gramas de EPA+DHA/dia) resultou em menor trigliceridemia e maior glicemia em jejum (THIFALT et al., 2013), avaliaram se os ômega-3 atuariam diretamente na expressão gênica dos indivíduos. Os autores forneceram a pessoas com sobrepeso em torno de 2,0 gramas de EPA+DHA/dia e analisaram os polimorfismos em nucleotídeos únicos no grupo genético de algumas dessaturases de ácidos graxos, além de marcadores do metabolismo energético, como o índice de resistência insulínica. Como resultado, foram encontradas importantes associações entre 16 polimorfismos das dessaturases e a suplementação com AGPI-3. Isso denota que o genótipo pode ser modulado pela intervenção dietética e interferir na concentração sanguínea de glicose, insulina e na resistência insulínica. Apesar de ainda não haver a concreta relação entre a atividade dessas dessaturases e a glicemia, acredita-se que haja papel das dessaturases na fluidez da membrana celular, modificando a quantidade e a afinidade dos receptores de insulina por esse hormônio. Quando isso ocorre no músculo, importante tecido captador de glicose sanguínea e dependente da ação da insulina para isso, pode haver modificação da glicemia por resistência insulínica. A teoria do envolvimento dos AGPI-3 nesse mecanismo é que sua suplementação interfere na atividade dessas enzimas, que quando menos ativas, tornam a membrana menos fluida.

Apesar de não ser o objetivo do estudo, investigações mais aprofundadas devem ser realizadas para o entendimento dos efeitos dos AGPI-3 na glicemia canina, pois os estudos ainda são controversos, e um dos possíveis motivos seja a metodologia aplicada para avaliação dos marcadores glicêmicos. Neste estudo, dentre as técnicas empregadas para a mensuração glicêmica, houve variação no resultado obtido.

### 6.5.2 VARIÁVEIS GLICÊMICAS CONVENCIONAIS

No HOVET-FMVZ/USP foi realizada a curva glicêmica convencional, com seis pontos: o primeiro com os animais em jejum e os outros cinco, com intervalo de duas horas, contados a partir da primeira refeição. Dois animais que não aceitaram o alimento no HOVET-FMVZ/USP não participaram da curva glicêmica convencional.

Na Tabela 8 podem ser observados os resultados das variáveis glicêmicas obtidas por meio da comparação das curvas glicêmicas convencionais realizadas após os animais terem recebido os dois alimentos do estudo (Figura 10). Não foram observadas diferenças em nenhum ponto das curvas (T0 a T10), bem como nas comparações dos valores médios, glicemia mínima, máxima, diferença entre máxima e mínima e área abaixo das curvas de glicemia entre os dois alimentos utilizados no estudo (Tabela 8).

No único trabalho encontrado na literatura no qual comparou-se diferentes alimentos na resposta glicêmica de cães diabéticos por meio de curva glicêmica contínua e convencional, os autores perceberam concordância dos resultados entre as metodologias (TEIXEIRA et al., 2018). Neste estudo de avaliação dos efeitos dos AGPI-3 na resposta metabólica dos cães diabéticos, acredita-se que a curva contínua tenha gerado os resultados mais fidedignos devido às limitações inerentes a metodologia de mensuração convencional.

Apesar de nos outros estudos com o propósito de avaliar os efeitos de diferentes alimentos no controle glicêmico de cães diabéticos (BLAXTER; CRIPPS; GRUFFYDD-JONES, 1990; NELSON et al., 1991; GRAHAM; MASKELL; NASH, 1994; KIMMEL et al., 2000; GRAHAM et al., 2002; FLEEMAN; RAND; MARKWELL, 2009; TESHIMA, 2010) ter sido realizada a curva glicêmica de no máximo 24 horas, com mensurações pontuais a cada duas horas, este método pode ser questionado.

Tabela 8 – Variáveis glicêmicas médias ( $\pm$  desvio padrão) da curva convencional de cães diabéticos (n=9) após ingestão de alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).

Variáveis (mg/dL)	Alimento C	Alimento A	Valor de P
T0	265,4 $\pm$ 113,2	295,1 $\pm$ 115,0	0,62 <sup>§</sup>
T2	208,6 $\pm$ 93,7	232,2 $\pm$ 117,4	0,65 <sup>§</sup>
T4	225,2 $\pm$ 98,8	252,6 $\pm$ 77,9	0,45 <sup>§</sup>
T6	265,5 $\pm$ 92,3	285,3 $\pm$ 77,9	0,60 <sup>§</sup>
T8	303,5 $\pm$ 87,9	317,2 $\pm$ 113,0	0,79 <sup>§</sup>
T10	321,2 $\pm$ 115,8	274,2 $\pm$ 70,8	0,26 <sup>‡</sup>
Média	264,9 $\pm$ 66,3	276,1 $\pm$ 72,8	0,70 <sup>§</sup>
Mínima	178,9 $\pm$ 88,3	204,2 $\pm$ 78,6	0,48 <sup>§</sup>
Máxima	375,2 $\pm$ 83,4	384,4 $\pm$ 97,4	0,91 <sup>‡</sup>
$\Delta$	196,3 $\pm$ 126,6	180,2 $\pm$ 87,5	0,70 <sup>§</sup>
AAC	2592,3 $\pm$ 701,7	2744,0 $\pm$ 760,8	0,63 <sup>§</sup>

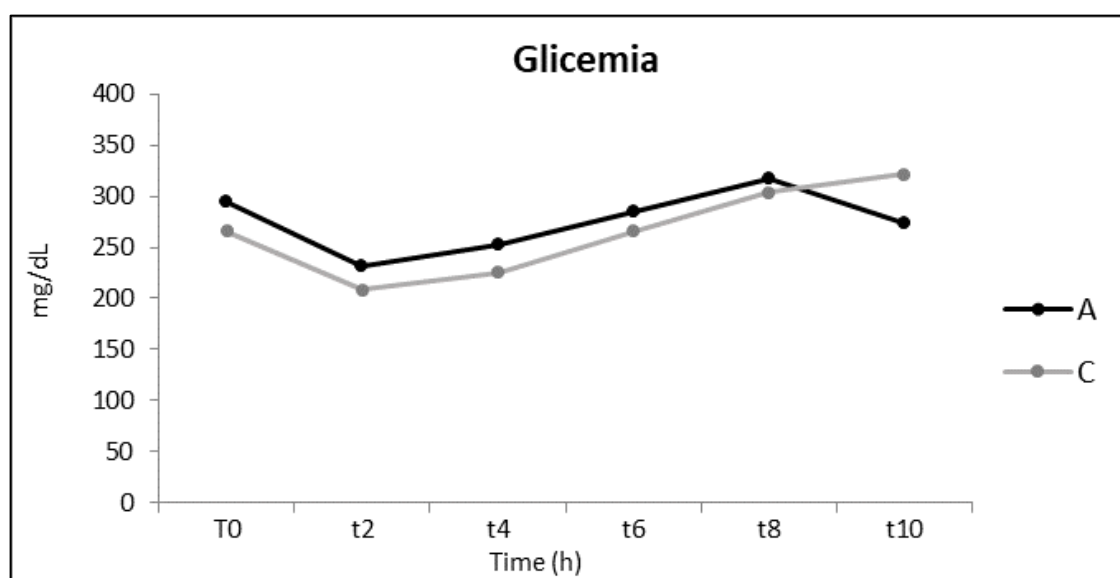
Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda:  $\Delta$  = diferença entre valores máximos e mínimos; AAC = área abaixo da curva.

\*Diferença entre os tratamentos quando valor de  $p \leq 0,05$ .

<sup>‡</sup>Valor de p obtido pelo teste de Wilcoxon. <sup>§</sup>Valor de P obtido pelo teste T pareado.

Figura 10 - Curvas glicêmicas médias de cães diabéticos (n=9) após ingestão do alimento controle (C; sem óleo de peixe) e teste (A; 5,0% de óleo de peixe).



Fonte: Teixeira, F.A. (2020).

Legenda: Linha cinza correspondente às mensurações pós alimento C (sem inclusão de óleo de peixe), e preta às mensurações pós alimento A (inclusão de 5,0% de óleo de peixe).

O primeiro ponto a ser discutido é o fato de existir uma ampla variação diária nas variáveis glicêmicas obtidas nas curvas de cães diabéticos, a ponto de

pesquisadores considerarem essas variações como implicações clínicas importantes aos cães com adequado controle glicêmico (FLEEMAN; RAND, 2003). Neste quesito, as curvas glicêmicas contínuas apresentam a vantagem de realizarem mais mensurações no mesmo espaço de tempo, de maneira menos invasiva e por período mais prolongado, o que minimizaria as oscilações diárias de glicemia (SURMAN; FLEEMAN, 2013).

Além disso, a curva glicêmica convencional gera a necessidade de repetidas punções venosas, que podem ser estressantes, dolorosas e causar anemia; há o risco de algum importante valor glicêmico, como o pico ou nadir, não ser registrado por coincidir com o momento entre duas colheitas de sangue; o número restrito de mensurações pode fornecer informações limitadas sobre as variações da glicemia, especialmente durante o período noturno (DAVISON et al., 2003; AFFENZELLER; THALHAMMER; WILLMANN, 2011; LYNCH et al., 2016). A metodologia contínua usada no presente experimento permitiu a separação dos valores glicêmicos, mensurados a cada 15 minutos, em períodos diurnos e noturnos. Já há dados na literatura que mostraram diferença entre as oscilações glicêmicas caninas durante o dia e a noite (MORI et al., 2013), o que coincidiu com o fato de algumas variáveis glicêmicas terem se comportado de maneira diferente entre os tratamentos aqui utilizados (alimento A x C) quando se comparou os valores de maneira separada entre diurnos e noturnos. A média glicêmica total foi diferente entre os dois períodos experimentais de alimentação dos cães, porém quando se dividiu a média total entre valores diurnos e noturnos, houve diferença nas mensurações noturnas, o que gera a hipótese de que a diferença na média total pode ter sido mais influenciada pelos valores noturnos, do que diurnos (Tabela 7).

Por fim, é preferível monitorar a glicemia por meio de mensurações no ambiente do paciente, já que as interpretações da curva glicêmica obtida em hospital podem ser de significância limitada devido a alterações na ingestão alimentar, na atividade física ou no nível de estresse (DAVISON et al., 2003; AFFENZELLER; THALHAMMER; WILLMANN, 2011).

Assim, dentre os estudos já citados que avaliaram o efeito da suplementação de AGPI-3 na glicemia canina (IRVINE et al., 2002; DE GODOY et al., 2015; DE GODOY; MCLEOD; HARMON, 2018), todos apresentaram ausência de efeito desta modificação dietética, assim como foi visto neste estudo com cães diabéticos. Porém, nenhum usou a metodologia de mensuração contínua, o que poderia ter gerado



resultados diferentes, como o aumento dos valores destas variáveis, mesmo nos indivíduos saudáveis.

Apesar de ter sido escolhido como a metodologia que melhor representou as respostas glicêmicas dos cães no estudo, deve-se ressaltar que o SMCG também apresenta algumas limitações.

### 6.5.3 USO DO SENSOR DE MENSURAÇÃO CONTÍNUA DE GLICEMIA

O sistema Free Style Libre foi usado poucas vezes em cães, mas sua acurácia foi avaliada em duas situações com cães diabéticos. Coradini et al. (2016) avaliaram a acurácia do sistema na espécie e concluíram que existe boa correlação entre a concentração de glicose intersticial mensurada por este SMCG e a concentração de glicose sanguínea mensurada pelo método enzimático, com a acurácia variando de 93 a 99% nas faixas de hipo, normo e hiperglicemia. Já com cães em cetoacidose diabética, também foi utilizado, mostrando boa acurácia clínica (MALERBA et al., 2020).

A correlação da concentração intersticial de glicose em cães com a glicemia mensurada em laboratório parece ser maior quando o sensor é implantado na lateral do tórax do que no pescoço, abdômen ou na região lombar (KOENIG; HOENIG; JIMENEZ, 2016). No presente trabalho, optou-se por utilizar o sensor na região lateral do pescoço por esta ter sido a localização usada no estudo que avaliou a acurácia deste SMCG (CORRADINI et al., 2016), além de que a avaliação do melhor posicionamento foi efetuada com sistema que usa outra metodologia de mensuração contínua de glicemia, que não o Free Style Libre (KOENIG; HOENIG; JIMENEZ, 2016).

Um ponto que pode ser considerado como limitação do estudo pela metodologia de mensuração glicêmica utilizada é o fato de em algumas curvas o SMCG não ter registrado os valores mensurados. Foi encontrado na literatura apenas um relato destes momentos sem mensuração em cães, obtido em estudo prévio deste grupo de pesquisa, no qual encontrou-se, com o aparelho iPro 2<sup>1</sup>, 11 curvas com falha no registro da mensuração glicêmica, do total de 30. Ao todo, as falhas representaram

---

<sup>1</sup>Medtronic, Minneapolis, Estados Unidos da América.

2,11% das mensurações esperadas (TEIXEIRA et al., 2018). No presente estudo, as falhas com o uso do Free Style Libre representaram ao todo 9,76% de momentos de mensuração sem informação. Não foi encontrado na literatura, nem em contato direto com o fabricante, o motivo dessas não mensurações.

Pela falha do sistema em mensurar a glicemia em todos os momentos, para o cálculo da área abaixo da curva foram feitas inferências dos valores que não estavam na curva. Optou-se por realizar a média entre os valores adjacentes ao intervalo não mensurado para preencher a lacuna. Já para o cálculo das outras variáveis, incluindo as proporções de mensurações em hipo- ou hiperglicemia, os momentos sem mensuração não foram utilizados no numerador nem no denominador da fórmula, minimizando a interferência desta ausência nos resultados.

Outra limitação deste SMCG é o fato do mesmo mostrar em tempo real a glicemia do paciente. No protocolo experimental instituído isso pode ser ruim, pois uma vez que os proprietários têm acesso instantâneo aos valores glicêmicos, estes poderiam interferir no tratamento com mudanças na dose ou no horário de aplicação da insulina. No entanto, não houve evidências de que isso tenha ocorrido no presente estudo.

## 6.6 PARTICULARIDADES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Além das limitações já citadas, como as problemáticas das metodologias de geração de curvas glicêmicas (convencional e SMCG), é importante comentar que a separação das lipoproteínas foi realizada pelo método FPLC e a composição lipídica das frações foi determinada pelas metodologias enzimáticas. Até o momento, parece não haver metodologia padrão ouro para mensuração das lipoproteínas caninas, porém essa é uma das utilizadas em outras pesquisas pois a mesma consegue isolar as frações de HDL e LDL que nos cães pode apresentar densidades similares (BAILHACHE et al., 2003; JERICÓ et al., 2009; SEAGE; DROBATZ; HESS, 2018). Independente disso, como o objetivo do estudo foi a avaliação do efeito da suplementação de AGPI-3 no perfil lipídico dos cães diabéticos, qualquer imprecisão na quantificação das lipoproteínas afetaria todas as mensurações, com minimização de possível viés metodológico.

Em estudos com novas metodologias de ultracentrifugação (XENOULIS et al., 2013, 2020), os autores caracterizaram as lipoproteínas caninas nos mesmos quatro grupos principais (quilomícron, VLDL, LDL e HDL), porém com a classificação em subclasses de LDL e HDL, de acordo com as faixas de densidade (d). A LDL foi subdividida em LDL<sub>1</sub> (d=1,019 a 1,023g/mL); LDL<sub>2</sub> (d=1,023 a 1,029g/mL); LDL<sub>3</sub> (d=1,029 a 1,039g/mL); LDL<sub>4</sub> (d=1,039 a 1,050g/mL) e LDL<sub>5</sub> (d=1,050-1,063g/mL). Enquanto a HDL foi separada em HDL<sub>2b</sub> (d=1,063 a 1,091g/mL); HDL<sub>2a</sub> (d=1,091 a 1,110g/mL); HDL<sub>3a</sub> (d=1,110 a 1,133g/mL), HDL<sub>3b</sub> (d=1,133 a 1,156g/mL) e HDL<sub>3c</sub> (d=1,156 a 1,179g/mL). Apesar de não ter sido demonstrada a superioridade desta metodologia, a possibilidade de maior fracionamento das lipoproteínas permitiu a identificação de diferentes perfis lipoproteicos entre os cães avaliados (XENOULIS et al., 2013).

Também pode ser citada como limitação a não mensuração de apolipoproteínas. Apesar de não ser o objetivo do estudo, isso permitiria o melhor entendimento do mecanismo de ação dos AGPI-3 no metabolismo lipídico, uma vez que há evidências de que em cães a Apo-B100 apresenta papel diferenciado no controle do transporte reverso do colesterol (BAILHACHE et al., 2004).

Um ponto importante a ser discutido é o fato de os cães terem ingerido maior quantidade de gordura total no período de ingestão do alimento A em comparação ao período que receberam o alimento C (Tabela 3). Isso pode ter afetado os resultados aqui apresentados, uma vez que Fleeman et al. (2009) mostraram que dieta com maior quantidade de gordura pode afetar a lipidemia de cães diabéticos. Entretanto, provavelmente aqueles autores observaram significativa influência do conteúdo dietético de gordura sobre a concentração plasmática de lipídeos porque os alimentos que eles utilizaram possuíam maior diferença na quantidade de gordura (2,45 a 5,75 gramas/100 kcal) do que o aqui empregado (alimento A de 3,3 a 4,5g de gordura/100 kcal, e alimento C de 3,7 a 4,2). Em estudos prévios já foi observado que maiores diferenças na quantidade de gordura [2,8 a 4,1g/100 kcal (TEIXEIRA et al., 2020) e 2,7 a 4,0g/100 kcal (ELLIOTT et al., 2012)] do que as aqui apresentadas, parecem não alterar a concentração sérica de triglicerídeos e colesterol. Assim, acredita-se que este não tenha sido um viés importante do estudo.

No contexto ingestão de gordura, não foi avaliada especificamente a ingestão de colesterol, o que poderia ter alguma influência nos resultados obtidos, diferente de outras pesquisas que padronizaram a quantidade de colesterol presente nos

alimentos fornecidos aos cães (WILSON et al., 1986; CAHILL et al., 1988; KAKIMOTO et al., 2017).

Ainda como limitação, pode-se dizer que onze animais compõem um grupo experimental pequeno, porém o delineamento *cross-over* diminui a necessidade de um número muito maior de animais. Na literatura, os únicos estudos que empregaram cães diabéticos, com enfoque da intervenção nutricional na hiperlipidemia, avaliaram 12 animais, em cada (FLEEMAN; RAND; MARKWELL, 2009; TEIXEIRA et al., 2020), número semelhante ao deste estudo.

Um diferencial da pesquisa em questão é o fato das mensurações glicêmicas terem sido realizadas por 8,5 horas, por meio do SMCG. Como este é o segundo estudo encontrado que utilizou a tecnologia do SMCG com este propósito dietético, há a limitação da falta de parâmetros de comparação a respeito da eficácia do método.

Com o intuito de isolar o efeito dos AGPI-3 sobre as variáveis avaliadas, a quantidade de insulina administrada foi mantida constante nos pacientes. Apesar de ser um fator para redução de viés, uma limitação do estudo foi a impossibilidade de utilização de doses intermediárias do medicamento, uma vez que a insulina utilizada foi do tipo NPH e, como alguns animais eram de pequeno porte, apresentavam tendência a hiperglicemia, mas com dose um pouco maior havia manifestações de hipoglicemia. A insulina NPH foi escolhida por ser a que os animais já estavam recebendo antes de começarem a participar do estudo e por seu custo ser mais baixo que os outros tipos de insulina disponíveis, fator importante já que a aquisição do fármaco era feita pelos proprietários dos cães.

Por se tratar de um estudo clínico que utilizou animais com DM naturalmente adquirido, a execução do protocolo experimental de maneira adequada dependeu muito do comprometimento dos proprietários. Ao longo de todo o estudo os proprietários eram orientados a fornecer a quantidade prescrita de alimento e insulina, nos horários definidos. Dentre todos os participantes do estudo, não houve evidência de que essas prerrogativas não foram seguidas.

Vale ressaltar como particularidade desta pesquisa a maior dose de EPA+DHA/kg de peso corporal utilizada (143mg/kg) dentre os estudos publicados na literatura, bem como a maior inclusão de óleo de peixe diretamente no alimento teste (5,0%). Por meio do uso de membrana celular das plaquetas como modelo, estudo anterior mostrou que a dose de 100mg de EPA/kg de peso corporal de cães saudáveis por dia resultou em aumento na incorporação de AGPI-3 na membrana celular das

plaquetas em relação ao grupo controle, que não foi suplementado. Os cães que consumiram o alimento com ômega-3 por oito semanas tiveram a concentração de 8,0% dos lipídios da membrana celular como EPA e 14,7% como ácido araquidônico (ômega-6), enquanto os animais que receberam alimento sem AGPI-3 mantinham, 1,8% de EPA e 19,8% de ácido araquidônico (OTSUJI et al., 1993). Outros estudos, com dose menor de ômega-3, também mostraram importante inclusão de AGPI-3 nas membranas celulares dos cães (IRVINE et al., 2002; STOECKEL et al., 2011; HESTA et al., 2012). Isso mostra que as doses utilizadas são suficientes para modificar o perfil lipídico dos cães, porém o ideal seria ter avaliado essa modificação de fosfolipídios nas membranas celulares dos cães diabéticos aqui estudados, inclusive como forma de avaliar se o período estabelecido de 30 dias seria o suficiente para os objetivos do estudo (MASSON et al., 2007).

Já foi demonstrado em cães que *washout* de 14 dias foi suficiente quando os animais receberam por duas semanas alimento com inclusão de 1,0% de óleo de peixe. Estudos prévios, com inclusão de 2,0%, utilizaram *washout* de 30 dias (DE GODOY et al., 2015; DE GODOY; MCLEOD; HARMON, 2018). Entretanto, não foi encontrado estudo com cães sob maiores inclusões ou doses de óleo de peixe, nem por período maior de fornecimento dos alimentos testados.

Em relação ao período, 90 dias pareceram ser suficientes para identificação de alterações no metabolismo lipídico dos cães diabéticos sob suplementação com AGPI-3, que já fora observada em menor tempo em estudos prévios (ARAUJO et al., 2012; DE GODOY; MCLEOD; HARMON, 2018). Em relação a resposta glicêmica, estudo anterior avaliou a suplementação de ômega-3 em cães saudáveis por 6 meses e não encontrou modificações nestas variáveis. Entretanto, não foram encontrados estudos com animais doentes que possam auxiliar na definição de melhor tempo experimental para confirmar ou descartar as possibilidades de efeitos da suplementação de EPA e DHA nas variáveis aqui estudadas que não apresentaram modificação com o delineamento instituído.

Como este estudo continua sendo conduzido com o acompanhamento de mais cães, ao final do protocolo experimental como um todo, outros marcadores serão mensurados, para ajudar na interpretação das respostas metabólicas dos cães diabéticos alimentados com ômega-3: concentração sérica de ácidos graxos não esterificados; corpos cetônicos, como o  $\beta$ -hidroxibutirado; frutossamina; composição corporal; medidas de estresse oxidativo e o perfil metabolômico dos cães diabéticos,

sob os dois tratamentos instituídos. Isso será interessante pois, além dos possíveis efeitos da suplementação de AGPI-3 sobre o controle lipidêmico e glicêmico, há evidências em outras espécies de que esses compostos poderiam atuar na diminuição da gordura abdominal (NOREEN et al., 2010; OOSTING et al., 2010; BENDER et al., 2014; DU et al., 2015; MANSOORI et al., 2016), prevenção da sarcopenia em idosos (SMITH et al., 2015), minimização do processo oxidativo de indivíduos diabéticos (INOBUCHI et al., 2000; GIACCO; BROWNLEE, 2010; MATSUDA; SHIMOMURA, 2013) e modificação do perfil metabólico de indivíduos diabéticos (ZHENG et al., 2016), que parecem estar alterados em cães com DM em comparação a animais saudáveis (O'KELL et al., 2017).

Apesar das limitações citadas e do status de não finalizado, o estudo aqui apresentado traz informações inéditas e importantes que podem auxiliar no manejo clínico e nortear o desenvolvimento de alimentos e suplementos para cães com alterações metabólicas. Além disso, devido a minimização de alguns possíveis vieses, os resultados encontrados podem servir de modelo para estudos com outras espécies, como humanos.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos para este grupo de onze animais, sob o delineamento experimental utilizado, pode-se afirmar que a suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 EPA e DHA, sob a forma de inclusão de 5,0% de óleo de peixe na dieta de cães diabéticos minimizou a colesterolemia, diminuiu a fração de colesterol nas VLDLs e nas lipoproteínas não-HDLs.

Quanto a trigliceridemia, esta inclusão de óleo de peixe não afetou as concentrações plasmáticas nem a distribuição dentre as lipoproteínas. Assim como não alterou o volume e o esvaziamento da vesícula biliar.

Por fim, as variáveis originadas das mensurações de glicose intersticial de cães diabéticos aumentaram após período de ingestão do alimento com óleo de peixe, em comparação aos mesmos cães ingerindo alimento semelhante sem a inclusão deste ingrediente.





## REFERÊNCIAS

AFFENZELLER, N.; THALHAMMER, J. G.; WILLMANN, M. Home-based subcutaneous continuous glucose monitoring in 10 diabetic dogs. **The Veterinary Record**, v. 169, n. 8, p. 206, 20 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21795310>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

AICHER, K. M. et al. Investigation of adrenal and thyroid gland dysfunction in dogs with ultrasonographic diagnosis of gallbladder mucocele formation. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, 2019.

ALBERT, B. B. et al. Higher omega-3 index is associated with increased insulin sensitivity and more favourable metabolic profile in middle-aged overweight men. **Scientific reports**, v. 4, p. 6697, 21 out. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep06697>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

ALBUQUERQUE, P. **Tratamento da hiperlipidemia primária com ácidos graxos ômega-3 em cães da raça schnauzer**. 2017. Universidade Santo Amaro, 2017.

ANIL, E. The impact of EPA and DHA on blood lipids and lipoprotein metabolism: Influence of apoE genotype. In: Proceedings of the Nutrition Society, 1, **Anais...**2007.

AOAC – ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. OFFICIAL AND TENTATIVE METHODS OF ANALYSIS. **AOAC - International**. 16. ed. Airlington: Virginia, 1995.

AOCS, – The American Oil Chemists Society. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. **American Oil Chemists Society**, 2014.

ARAUJO, M. M. G. et al. Evaluation of serum cholesterol and triglycerides in healthy dogs supplemented with ômega-3. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1491–1496, 2012.

BAGDADE, J. D. et al. Accelerated cholesteryl ester transfer in noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 104, n. 1–2, p. 69–77, 1993.

BAGDADE, J. D.; RITTER, M.; SUBBAIAH, P. V. Marine lipids normalize cholesteryl ester transfer in IDDM. **Diabetologia**, v. 39, n. 4, p. 487–491, 1996.

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

BAILHACHE, E. et al. Metabolism of cholesterol of apolipoprotein B100-containing lipoproteins in dogs: Evidence for disregarding cholesterol transfer. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 34, n. 8, p. 527–534, 2004.

BANG, H. O.; DYERBERG, J.; HJØRNE, N. The Composition of Food Consumed by Greenland Eskimos. **Acta Medica Scandinavica**, v. 200, n. 1–6, p. 69–73, 1976. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.0954-6820.1976.tb08198.x>>.

BARRIE, J. et al. Plasma cholesterol and lipoprotein concentrations in the dog: The

effects of age, breed, gender and endocrine disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, n. 10, p. 507–512, 1993.

BARROUIN-MELO, S. M. et al. Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, 2016.

BAUER, J. Therapeutic use of fish oils in companion animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association** ..., v. 239, n. 11, p. 1441–1451, 2011. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.239.11.1441>>. Acesso em: 12 set. 2014.

BAUER, J. E. Comparative Lipid and Lipoprotein Metabolism. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 25, n. 2, p. 49–56, 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-165X.1996.tb00968.x>>.

BAUER, J. E. The essential nature of dietary omega-3 fatty acids in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 249, n. 11, p. 1267–1272, dez. 2016. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/10.2460/javma.249.11.1267>>. Acesso em: 3 set. 2017.

BAYS, H. E. et al. **Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: Physiologic mechanisms of action and clinical implications** *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2008. .

BEHREND, E. N. Canine hyperadrenocorticism. In: FELDMAN, E. C. et al. (Ed.). **Canine and Feline Endocrinology**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2015. p. 377–451.

BEITZ, D. C. Metabolismo lipídico. In: REECE, W. O. (Ed.). **Dukes Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 476–492.

BENDER, N. et al. Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews**, v. 15, n. 8, p. 657–665, ago. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/obr.12189>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

BERR, F. et al. Dietary N-3 polyunsaturated fatty acids decrease biliary cholesterol saturation in gallstone disease. **Hepatology**, v. 16, n. 4, p. 960–967, 1 out. 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.1840160418>>. Acesso em: 6 set. 2017.

BI, X. et al.  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids ameliorate type 1 diabetes and autoimmunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 5, p. 1757–1771, 1 maio 2017. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/87388>>. Acesso em: 6 set. 2017.

BJORNSTAD, P. et al. Relation of Combined Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol and Apolipoprotein B with Atherosclerosis in Adults with Type 1 Diabetes Mellitus. **American Journal of Cardiology**, v. 116, n. 7, p. 1057–1062, 2015.

BLAXTER, A. C.; CRIPPS, P. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Dietary fibre and post prandial hyperglycaemia in normal and diabetic dogs. **Journal of Small Animal**

**Practice**, v. 31, n. 5, p. 229–233, maio 1990. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-5827.1990.tb00790.x>>. Acesso em: 8 ago. 2014.

BODKIN, K. Seizures Associated with Hyperlipoproteinemia in A Miniature Schnauzer. **Canine Practice**, v. 17, n. 1, p. 11–15, 1992. Disponível em: <isi:A1992HC78500002>.

BOOKER, M. L.; SCOTT, T. E.; LA MORTE, W. W. Effects of dietary fish oil on biliary phospholipids and prostaglandin synthesis in the cholesterol-fed pairie dog. **Lipids**, v. 25, n. 1, p. 27–32, jan. 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02562424>>. Acesso em: 6 set. 2017.

BRADA, Z.; TOBISKA, J. Heterogeneity of the haemoglobin of the black rat. *Rattus rattus*. **Folia Biologica**, v. 13, n. 3, p. 200–203, 1967.

BRUM, A. et al. Óleo de peçcado como suplemento dietético. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v. 10, n. 19, p. 71–78, 2002.

BRUNETTO, M. A. et al. Correspondence between obesity and hyperlipidemia in dogs. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 266–271, 2011.

CADARIO, F. et al. Vitamin D and  $\omega$ -3 supplementations in mediterranean diet during the 1st year of overt type 1 diabetes: A cohort study. **Nutrients**, v. 11, n. 9, 2019.

CAHILL, P. D. et al. Inhibition of vein graft intimal thickening by eicosapentanoic acid: Reduced thromboxane production without change in lipoprotein levels or low-density lipoprotein receptor density. **Journal of Vascular Surgery**, v. 7, n. 1, p. 108–118, 1988.

CARIATI, A.; PIROMALLI, E. Could omega-3 fatty acid prolonged intake reduce the incidence of symptomatic cholesterol gallstones disease? **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 486–487, 2013.

CASALI, R. E. et al. Improved graft patency associated with altered platelet function induced by marine fatty acids in dogs. **Journal of Surgical Research**, v. 40, n. 1, p. 6–12, 1986.

CATANOZI, S. Dislipidemias. In: JERICO, M. M.; NETO, J. P. DE A.; KOGIKA, M. M. (Ed.). **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2015. p. 1780–1793.

CHEUNG, M. C.; WOLFBAUER, G.; ALBERS, J. J. Plasma phospholipid mass transfer rate: Relationship to plasma phospholipid and cholesteryl ester transfer activities and lipid parameters. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1303, n. 2, p. 103–110, 1996.

CHIKAMUNE, T. et al. Serum lipid and lipoprotein concentrations in obese dogs. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 57, n. 4, p. 595–8, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8519883>>.

COLE, T. G. et al. Association of apolipoprotein B and nuclear magnetic resonance

spectroscopy-derived LDL particle number with outcomes in 25 clinical studies: Assessment by the AACC lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 752–770, 2013.

COOK, A. K. et al. Risk factors associated with acute pancreatitis in dogs: 101 cases (1985-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 5, p. 673–679, 1993.

COOK, A. K.; JAMBHEKAR, A. V.; DYLEWSKI, A. M. Gallbladder Sludge in Dogs: Ultrasonographic and Clinical Findings in 200 Patients. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 52, n. 3, p. 125–131, 2 maio 2016. Disponível em: <<http://jaaha.org/doi/10.5326/JAAHA-MS-6282>>. Acesso em: 1 ago. 2017.

CORMIER, H. et al. Polymorphisms in Fatty Acid Desaturase (FADS) gene cluster: Effects on glycemic controls following an omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) supplementation. **Genes**, v. 4, n. 3, p. 485–498, 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4425/4/3/485/pdf%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2013575561>>.

CORRADINI, S. et al. Accuracy of a Flash Glucose Monitoring System in Diabetic Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, maio 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jvim.14355>>. Acesso em: 27 jun. 2016.

COSTA-SANTOS, K. et al. Lipid and metabolic profiles in female dogs with mammary carcinoma receiving dietary fish oil supplementation. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, 2019.

CRISPIN, S. M. Ocular Manifestations of Hyperlipoproteinemia. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, n. 10, p. 500–506, 1993. Disponível em: <isi:A1993ME52400005>.

DANDRIEUX, J. R. S. Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same? **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 11, p. 589–599, 2016.

DANIELSSON, B. et al. Plasma lipoprotein changes in experimental cholestasis in the dog. **Clinica Chimica Acta**, v. 80, n. 1, p. 157–170, 1977.

DAVISON, L. J. et al. Evaluation of a continuous glucose monitoring system in diabetic dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 44, n. 10, p. 435–442, 2003.

DE GODOY, M. R. C. et al. Influence of feeding a fish oil-containing diet to young, lean, adult dogs: effects on lipid metabolites, postprandial glycaemia and body weight. **Archives of Animal Nutrition**, v. 69, n. 6, p. 499–514, 2015.

DE GODOY, M. R. C.; MCLEOD, K. R.; HARMON, D. L. Influence of feeding a fish oil-containing diet to mature, overweight dogs: Effects on lipid metabolites, postprandial glycaemia and body weight. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 1, p. e155–e165, 2018.

DE MARCO, V. et al. Therapy of Canine Hyperlipidemia with Bezafibrate. **Journal of**

**Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 717–722, 2017.

DENG, X. et al. Docosahexaenoic acid inhibits proteolytic processing of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) via activation of AMP-activated kinase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 12, p. 1521–1529, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbailip.2015.08.007>>.

DIBARTOLA, S. P. et al. Clinicopathologic findings in dogs with renal amyloidosis: 59 cases (1976-1986). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 3, p. 358–64, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2768063>>.

DU, S. et al. Does Fish Oil Have an Anti-Obesity Effect in Overweight/Obese Adults? A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142652, 16 nov. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0142652>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

DULLAART, R. P. F. et al. Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 24, n. 3, p. 188–194, 1994.

ELLIOTT, K. F. et al. Use of a meal challenge test to estimate peak postprandial triglyceride concentrations in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 2, p. 161–168, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281189>>. Acesso em: 1 ago. 2017.

ELLIOTT, K. F. et al. A diet lower in digestible carbohydrate results in lower postprandial glucose concentrations compared with a traditional canine diabetes diet and an adult maintenance diet in healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 288–95, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528811003390>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

ENDO, J.; ARITA, M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Cardiology**, v. 67, n. 1, p. 22–27, jan. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0914508715002300>>. Acesso em: 6 set. 2017.

ESLICK, G. D. et al. Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cardiology**, v. 136, n. 1, p. 4–16, 2009. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=2009332442>>.

FAKHRZADEH, H. et al. The effects of low dose n-3 fatty acids on serum lipid profiles and insulin resistance of the elderly: A randomized controlled clinical trial. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 80, n. 2, p. 107–116, 2010.

FARMERY, A. K. et al. Consuming sustainable seafood: Guidelines, recommendations and realities. **Public Health Nutrition**, v. 21, n. 8, p. 1503–1514, 2018.

FASCETTI, A. J.; DELANEY, S. J. Nutritional Management of Endocrine Diseases. In: FASCETTI, A. J.; DELANEY, S. J. (Ed.). **Applied Veterinary Clinical Nutrition**. 1. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. p. 289–301.

FASOLI, A. et al. Serum Lipoproteins in Experimental Diabetes. I. Serum Lipoprotein Pattern of Normal and Depancreatized Dogs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 85, n. 4, p. 609–613, 1954.

FLEEMAN, L. M.; RAND, J. S. Evaluation of day-to-day variability of serial blood glucose concentration curves in diabetic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 3, p. 317–21, 1 fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12564593>>. Acesso em: 29 fev. 2016.

FLEEMAN, L. M.; RAND, J. S.; MARKWELL, P. J. Lack of advantage of high-fibre, moderate-carbohydrate diets in dogs with stabilised diabetes. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 50, n. 11, p. 604–14, nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19814767>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

FORD, R. B. Idiopathic Hyperchylomicronemia in Miniature Schnauzers. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, n. 10, p. 488–492, 1993. Disponível em: <isi:A1993ME52400003>.

FORD, R. B.; LUDLOW, C. L. Disorders of Lipid Metabolism. In: HAND, M. S. et al. (Ed.). **Small Animal Clinical Nutritional**. 5. ed. Kansas: Mark Morris Institute, 2010. p. 545–557.

FRANZ, M. J. et al. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. **Diabetes Care**, v. 26, n. SUPPL. 1, p. S51–S61, 2003. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0038077584&partnerID=40&md5=7e71293cb64ba4a380f456e11248af0e>>.

FRIDAY, K. E. et al. Elevated plasma glucose and lowered triglyceride levels from omega-3 fatty acid supplementation in type II diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, n. 4, p. 276–281, 1989.

FRIEDBERG, C. E. et al. Fish oil and glycemic control in diabetes: A meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 21, n. 4, p. 494–500, 1998. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed4&NEWS=N&AN=1998125618>>.

FURROW, E. et al. Proteinuria and lipoprotein lipase activity in Miniature Schnauzer dogs with and without hypertriglyceridemia. **Veterinary Journal**, v. 212, p. 83–89, 2016.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058–1070, 2010. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/content/107/9/1058>>.

GLEESON, J. M. et al. Plasma apolipoprotein E, high density lipoprotein1 (HDL1) and urinary mevalonate excretion in pancreatectomized diabetic dogs: effects of insulin and lovastatin. **Atherosclerosis**, v. 84, n. 1, p. 1–12, 1990.

GRAHAM, P. A. et al. Influence of a high fibre diet on glycaemic control and quality of life in dogs with diabetes mellitus. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, n. 2, p. 67–73, fev. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00031.x>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

GRAHAM, P. A.; MASKELL, I. E.; NASH, A. S. Canned high fiber diet and postprandial glycemia in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. **The Journal of Nutrition**, v. 124, n. 12 Suppl, p. 2712S-2715S, dez. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7996276>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

GREENE, J. et al. Fish oils, coronary heart disease, and the environment. **American Journal of Public Health**, v. 103, n. 9, p. 1568–1576, 2013.

GROSS, K. L. et al. Macronutrients. In: HAND, M. S. et al. (Ed.). **Small Animal Clinical Nutritional**. 5. ed. Topeka, Kansas: Mark Morris Institute, 2010. p. 49–105.

GUEVARA, M. A. et al. Chemical composition, in vitro fermentation characteristics, and in vivo digestibility responses by dogs to select corn fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1619–1626, 2008.

GUYARD-DANGREMONT, V. et al. Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 3, p. 517–525, 1998.

HAA, Y. C.; BARTER, P. J. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, v. 71, n. 2, p. 265–269, 1982.

HALL, J. A. et al. Effect of dietary n-6-to-n-3 fatty acid ratio on complete blood and total white blood cell counts, and T-cell subpopulations in aged dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 3, p. 319–327, 1999.

HAMDY, O.; BARAKATUN-NISAK, M.-Y. Nutrition in Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 799–817, dez. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889852916300688>>. Acesso em: 27 ago. 2017.

HANSELMAN, B. et al. Hyponatremia and hyperlipidemia in a dog with central nervous system lymphosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 1029–1032, 2006.

HARRIS, W. S. n-3 Fatty acids and serum lipoproteins: Human studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 5 SUPPL., p. 1611S–6S, 1997.

HARRIS, W. S. International recommendations for consumption of long-chain omega-3 fatty acids. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 8, n. SUPPL. 1, 2007.

HARTWEG, J. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2008. Disponível em: <[http://www.mrw.interscience.wiley.com/cochrane/clsystrev/articles/CD003205/pdf\\_fs.html%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed8&N](http://www.mrw.interscience.wiley.com/cochrane/clsystrev/articles/CD003205/pdf_fs.html%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed8&N)>

EWS=N&AN=2008281067>.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1306–1311, 1993.

HERDT, T. H.; SAYEGH, A. I. Utilização dos nutrientes após a absorção. In: KLEIN, B. G. (Ed.). **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**. 5. ed. [s.l.] Elsevier Saunders, 2014. p. 342–358.

HESS, R. S. et al. Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic abnormalities in dogs with fatal acute pancreatitis: 70 cases (1986-1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 5, p. 665–670, 1998.

HESS, R. S.; KASS, P. H.; VAN WINKLE, T. J. Association between Diabetes Mellitus, Hypothyroidism or Hyperadrenocorticism, and Atherosclerosis in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 4, p. 489–494, 2003.

HESTA, M. et al. Biological effects of short-term salmon oil administration, using distinct salmon oil sources in healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 12, p. 699–704, 2012.

HILL, R. C.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia animal**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HOENIG, M. et al. Glucose tolerance and lipid profiles in dogs fed different fiber diets. **Veterinary Therapeutics**, v. 2, n. 2, p. 160–169, jan. 2001.

INOBUCHI, T. et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1939–1945, 2000. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/49/11/1939>>.

IRVINE, A. J. et al. Dietary supplementation with (n-3) polyunsaturated fatty acids does not affect insulin sensitivity in healthy Labrador retriever dogs. **The Journal of nutrition**, v. 132, p. 1709S-1710S, 2002. Disponível em: <<http://nutrition.highwire.org/content/132/6/1709S.full>>. Acesso em: 6 jun. 2014.

JENKINS, D. J. A. et al. Are dietary recommendations for the use of fish oils sustainable? **CMAJ**, v. 180, n. 6, p. 633–637, 2009.

JEPPESEN, C.; SCHILLER, K.; SCHULZE, M. B. Omega-3 and omega-6 fatty acids and type 2 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 13, n. 2, p. 279–288, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11892-012-0362-8>>.

JERGENS, A. E. et al. Microbiota-related changes in unconjugated fecal bile acids are associated with naturally occurring, insulin-dependent diabetes mellitus in dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. JUN, 2019.

JERICÓ, M. M. et al. Chromatographic analysis of lipid fractions in healthy dogs and dogs with obesity or hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 2, p. 203–207, 2009. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L35>>



4329177%0Ahttp://www.jvdi.org/cgi/reprint/21/2/203>.

JEUSETTE, I. C. et al. Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 1, 2005.

JOHN CHAPMAN, M. Comparative Analysis of Mammalian Plasma Lipoproteins. **Methods in Enzymology**, v. 128, n. C, p. 70–143, 1986. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687986280635>>.

JOHNSON, B. M. et al. Comparison of a human portable blood glucose meter, veterinary portable blood glucose meter, and automated chemistry analyzer for measurement of blood glucose concentrations in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 11, p. 1309–1313, 1 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951099>>. Acesso em: 14 out. 2015.

KAGAWA, Y. et al. Systemic atherosclerosis in dogs: Histopathological and immunohistochemical studies of atherosclerotic lesions. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, n. 3, p. 195–206, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997505801264>>.

KAKIMOTO, T. et al. Effect of a high-fat–high-cholesterol diet on gallbladder bile acid composition and gallbladder motility in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 12, p. 1406–1413, 2017.

KASIM, S. E. et al. Effects of omega-3 fish oils on lipid metabolism, glycemic control, and blood pressure in type II diabetic patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 67, n. 1, p. 1–5, 1988.

KIENZLE, E.; DOBENECKER, B.; EBER, S. Effect of cellulose on the digestibility of high starch versus high fat diets in dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 85, n. 5–6, p. 174–185, 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0396.2001.00315.x>>.

KIM, A. Y. et al. Serum adipokine concentrations in dogs with diabetes mellitus: A pilot study. **Journal of Veterinary Science**, v. 16, n. 3, p. 333–340, 2015.

KIMMEL, S. E. et al. Effects of insoluble and soluble dietary fiber on glycemic control in dogs with naturally occurring insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 7, p. 1076–81, 1 abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10754666>>. Acesso em: 17 jul. 2014.

KLOSTERMAN, E. S.; PRESSLER, B. M. Nephrotic Syndrome in Dogs: Clinical Features and Evidence-Based Treatment Considerations. **Topics in companion animal medicine**, v. 26, n. 3, p. 135–142, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.004%0Apapers2://publication/doi/10.1053/j.tcam.2011.04.004>>.

KLUGER, E. K. et al. Serum triglyceride concentration in dogs with epilepsy treated with phenobarbital or with phenobarbital and bromide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n. 8, p. 1270–1277, 2008. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.233.8.1270>>.

KOENIG, A.; HOENIG, M. E.; JIMENEZ, D. A. Effect of sensor location in dogs on performance of an interstitial glucose monitor. **American Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 8, p. 805–817, 2016.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological Studies in the Upernavik District, Greenland: Incidence of Some Chronic Diseases 1950–1974. **Acta Medica Scandinavica**, v. 208, n. 1–6, p. 401–406, 1980.

KUTSUNAI, M. et al. The association between gall bladder mucoceles and hyperlipidaemia in dogs: A retrospective case control study. **Veterinary Journal**, v. 199, n. 1, p. 76–79, jan. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023313005339>>. Acesso em: 1 ago. 2017.

KWONG, L. K. et al. Intestinal and hepatic cholesterogenesis in hypercholesterolemic dyslipidemia of experimental diabetes in dogs. **Diabetes**, v. 40, n. 12, p. 1630–1639, 1991.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice**, v. 22, n. 4, p. 10–15, 1997.

LANDYMORE, R. W. et al. Cod-liver oil in the prevention of intimal hyperplasia in autogenous vein grafts used for arterial bypass. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 89, n. 3, p. 351–357, 1985.

LE BLOC'H, J. et al. Nicotinic acid accelerates HDL cholesteryl ester turnover in obese insulin-resistant dogs. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.

LEBLANC, C. J. et al. Effect of dietary fish oil and vitamin E supplementation on hematologic and serum biochemical analytes and oxidative status in young dogs. **Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine**, v. 6, n. 4, p. 325–40, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550494>>.

LEE, S.; KWEON, O. kyeong; KIM, W. H. Associations between serum leptin levels, hyperlipidemia, and cholelithiasis in dogs. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, 2017.

LENOX, C. E.; BAUER, J. E. Potential adverse effects of omega-3 Fatty acids in dogs and cats. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 27, n. 2, p. 217–226, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23323770>>.

LEVY, E. et al. **Intestinal cholesterol transport proteins: An update and beyond** *Current Opinion in Lipidology*, 2007. .

LICHTENSTEIN, A. H. et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, v. 114, n. 1, p. 82–96, 2006. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44305278%0Ahttp://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.176158>>.

LITTMAN, M. P. et al. Familial protein-losing enteropathy and protein-losing nephropathy in Soft Coated Wheaten Terriers: 222 cases (1983-1997). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 14, n. 1, p. 68–80, 2000.

LIU, S. K. et al. Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970-1983). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 2, p. 227–232, 1986.

LYNCH, A. M. et al. Hospital-acquired Anemia in Critically Ill Dogs and Cats: A Multi-Institutional Study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 1, p. 141–146, 2016.

MAGNUSON, T. H. et al. Dietary fish oil inhibits cholesterol monohydrate crystal nucleation and gallstone formation in the prairie dog. **Surgery**, v. 118, n. 3, p. 517–523, set. 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003960600580368X>>. Acesso em: 6 set. 2017.

MAHLEY, R. W. et al. Canine hyperlipoproteinemia and atherosclerosis. Accumulation of lipid by aortic medial cells in vivo and in vitro. **American Journal of Pathology**, v. 87, n. 1, p. 205–225, 1977.

MALERBA, E. et al. Accuracy of a flash glucose monitoring system in dogs with diabetic ketoacidosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 1, p. 83–91, 2020.

MANSOORI, A. et al. Docosahexaenoic Acid-Rich Fish Oil Supplementation Improves Body Composition without Influence of the PPAR $\alpha$  Pro12Ala Polymorphism in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 8, n. 4–6, p. 195–204, 3 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000442792>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

MASSON, S. et al. Incorporation and washout of n-3 polyunsaturated fatty acids after diet supplementation in clinical studies. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 8, n. SUPPL. 1, 2007.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. **Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer** *Obesity Research and Clinical Practice*, 2013. Disponível em: <[https://www.obesityresearchclinicalpractice.com/article/S1871-403X\(13\)00043-4/fulltext#sec0075](https://www.obesityresearchclinicalpractice.com/article/S1871-403X(13)00043-4/fulltext#sec0075)>.

MAZAKI-TOVI, M.; ABOOD, S. K.; SCHENCK, P. A. Fish oil supplementation increases concentration of adiponectin in healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 55, n. 5, p. 247–253, 2014.

MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. et al. Fish oil (n-3) polyunsaturated fatty acids beneficially affect biliary cholesterol nucleation time in obese women losing weight. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 9, p. 2300–3, 1 set. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533270>>. Acesso em: 6 set. 2017.

MESICH, M. L. L. et al. Gall bladder mucocèles and their association with endocrinopathies in dogs: A retrospective case-control study. **Journal of Small Animal Practice**, v. 50, n. 12, p. 630–635, 2009.

MIZUGUCHI, K. et al. Preventive effects of eicosapentaenoic acid (EPA) on cholesterol gallstone formation in hamsters. **Folia Pharmacologica Japonica**, v. 110, n. SUPPL. 1, 1997.

MORGADO, N.; RIGOTTI, A.; VALENZUELA, A. Comparative effect of fish oil feeding and other dietary fatty acids on plasma lipoproteins, biliary lipids, and hepatic expression of proteins involved in reverse cholesterol transport in the rat. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 49, n. 6, p. 397–406, 2005.

MORI, A. et al. Comparison of Glucose Fluctuations between Day- and Night-Time Measured Using a Continuous Glucose Monitoring System in Diabetic Dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 1, p. 113–117, 31 jan. 2013. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/75/1/75\\_12-0123/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/75/1/75_12-0123/_article)>. Acesso em: 7 ago. 2015.

MORI, N. et al. Potential use of cholesterol lipoprotein profile to confirm obesity status in dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 35, n. 4, p. 223–235, 2011.

MORI, T. A. et al. Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: Effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 817–825, 1999.

MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E. B. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **World Health Organization technical report series**, v. 916, n. 15, p. 1885–1899, 2003. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42665/1/WHO\\_TRS\\_916.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42665/1/WHO_TRS_916.pdf)>. Acesso em: 7 ago. 2015.

MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E. B. Dietary intake of fats and fatty acids for the United States population: 1999–2000. **Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 15, p. 1885–1899, 2006a.

MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E. B. Fish intake, contaminants, and human health evaluating the risks and the benefits. **Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 15, p. 1885–1899, 2006b.

MUIR, H. E. et al. Nutrient Digestion by Ileal Cannulated Dogs as Affected by Dietary Fibers with Various Fermentation Characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 7, p. 1641–1648, 1996.

MUZÍK, P. et al. Diabetes mellitus in dogs and cats – clinical experience with bioactive chromium supplementation in dogs treated with insulin. **The European Journal of Companion Animal Practice**, v. 21, n. 1, p. 62–67, 2011. Disponível em: <<http://www.fecava.org/ejcap/ejcap-21-1>>.

NELSON, R. W. Disorders of the endocrine pancreas. In: ETTINGER, S. J. (Ed.). **Textbook of veterinary internal medicine - Diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. p. 1676–1720.

NELSON, R. W. et al. Effects of dietary fiber supplementation on glycemic control in dogs with alloxan-induced diabetes mellitus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 12, p. 2060–2066, dez. 1991.

NELSON, R. W. et al. Effect of dietary insoluble fiber on control of glycemia in dogs with naturally acquired diabetes mellitus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 3, p. 380–386, 1 fev. 1998.

NELSON, R. W. Alterações endócrinas do pâncreas. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. (Ed.). **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 2010. p. 765–811.

NELSON, R. W. Canine diabetes mellitus. In: FELDMAN, E. C. et al. (Ed.). **Canine and Feline Endocrinology**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2015. p. 214–257.

NELSON, R. W.; LEWIS, L. D. Nutritional management of diabetes mellitus. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v. 5, n. 3, p. 178–86, ago. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2236981>>. Acesso em: 1 jul. 2014.

NESTEL, P. J. et al. Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 1, p. 82–89, 1984.

NIETO, C. G. et al. Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 3–4, p. 175–182, 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030440179290115P>>.

NOREEN, E. E. et al. Effects of supplemental fish oil on resting metabolic rate, body composition, and salivary cortisol in healthy adults. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 31, 2010. Disponível em: <<http://jissn.biomedcentral.com/articles/10.1186/1550-2783-7-31>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

NRC. **Nutrients Requirements of Dogs and Cats**. Washington, DC: National Academy Press, 1985.

NRC. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. 1. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2006.

O’KELL, A. L. et al. Untargeted metabolomic analysis in naturally occurring canine diabetes mellitus identifies similarities to human Type 1 Diabetes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9467, 25 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28842637>>. Acesso em: 4 set. 2017.

O’NEILL, S. et al. Evaluation of cytokines and hormones in dogs before and after treatment of diabetic ketoacidosis and in uncomplicated diabetes mellitus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 3–4, p. 276–283, 2012.

OGILVIE, G. K. et al. Alterations in Lipoprotein Profiles in Dogs With Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, n. 1, p. 62–66, 1994.

OH, D. Y. et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687–698, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410008883>>. Acesso em:

6 set. 2017.

OKI, J. C. Dyslipidemias in Patients With Diabetes Mellitus: Classification and Risks and Benefits of Therapy. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 15, n. 3, p. 317–337, 1995.

ONTSOUKA, C. E. et al. Polyunsaturated fatty acid-enriched diets used for the treatment of canine chronic enteropathies decrease the abundance of selected genes of cholesterol homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 38, n. 1, p. 32–37, 2010.

OOSTING, A. et al. N-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Excessive Fat Deposition in Adulthood in a Mouse Model of Postnatal Nutritional Programming. **Pediatric Research**, v. 68, n. 6, p. 494–499, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1203/PDR.0b013e3181f74940>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

OTSUJI, S. et al. Highly purified eicosapentaenoic acid attenuates tissue damage in experimental myocardial infarction. **JAPANESE CIRCULATION JOURNAL**, v. 57, n. 4, p. 335–343, 1993.

OUGUERRAM, K. et al. Selective uptake of high density lipoproteins cholesteryl ester in the dog, a species lacking in cholesteryl ester transfer protein activity: An in vivo approach using stable isotopes. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, n. 4, p. 339–345, 2004.

PANASEVICH, M. R. et al. Potato fiber as a dietary fiber source in dog foods. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 11, p. 5344–5352, 2013.

PERTSEMLIDIS, D.; KIRCHMAN, E. H.; AHRENS, E. H. Regulation of cholesterol metabolism in the dog. I. Effects of complete bile diversion and of cholesterol feeding on absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 9, p. 2353–2367, 1973.

PROSKY, L. et al. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 5, p. 1017–1023, 1992.

RADER, D. J. et al. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S189–S194, 2009. Disponível em: <<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R800088-JLR200>>.

ROGERS, W. A.; DONOVAN, E. F.; KOCIBA, G. J. Lipids and lipoproteins in normal dogs and in dogs with secondary hyperlipoproteinemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 166, n. 11, p. 1092–1100, 1975.

RUCINSKY, R. et al. AAHA diabetes management guidelines. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 3, p. 215–24, 2010. Disponível em: <<http://www.jaaha.org/content/46/3/215.short>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

SCHACHTER, S.; NELSON, R. W.; KIRK, C. A. Oral chromium picolinate and control

of glycemia in insulin-treated diabetic dogs. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 4, p. 379–84, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11467597>>. Acesso em: 29 jul. 2014.

SCHENCK, P. A. Canine Hyperlipidemia. In: The North American Veterinary Conference – 2005 Proceedings, Orlando. **Anais...** Orlando: IVIS, 2005.

SCOBAY, M. W. et al. Dietary fish oil effects on biliary lipid secretion and cholesterol gallstone formation in the African green monkey. **Hepatology**, v. 14, n. 4, p. 679–684, 1 out. 1991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.1840140417>>. Acesso em: 6 set. 2017.

SCOTT-MONCRIEFF, J. C. Hypothyroidism. In: FELDMAN, E. C. et al. (Ed.). **Canine and Feline Endocrinology**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2015. p. 77–135.

SEAGE, E. C.; DROBATZ, K. J.; HESS, R. S. Spectrophotometry and Ultracentrifugation for Measurement of Plasma Lipids in Dogs with Diabetes Mellitus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 1, p. 93–98, 2018.

SILVIO, J. et al. Influence of fiber fermentability on nutrient digestion in the dog. **Nutrition**, v. 16, n. 4, p. 289–295, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900799002981>>.

SIMONS, K.; IKONEN, E. How cells handle cholesterol. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1721–1726, 2000.

SMITH, G. I. et al. Fish oil-derived n-3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 115–122, 1 jul. 2015. Disponível em: <<http://ajcn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/ajcn.114.105833>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

SMITH, R. E. et al. Clinical Consequences of Hypertriglyceridemia-Associated Proteinuria in Miniature Schnauzers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1740–1748, 2017.

SOTTIAUX, J. Atherosclerosis in a dog with diabetes mellitus. **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, n. 12, p. 581–584, dez. 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-5827.1999.tb03027.x>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

SPEARS, J. W.; BROWN, T. T. Influence of chromium on glucose metabolism and insulin sensitivity. (G. A. Reinhart, D. P. Carey, Eds.) In: Recent Advances in Canine and Feline Nutrition, Proceedings from the Iams Nutrition Symposium, Wilmington. **Anais...** Wilmington: Iams Company, 1998.

SPRAGUE, M.; DICK, J. R.; TOCHER, D. R. Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon, 2006-2015. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

STOECKEL, K. et al. Fatty acid patterns of dog erythrocyte membranes after feeding of a fish-oil based DHA-rich supplement with a base diet low in n-3 fatty acids versus a diet containing added n-3 fatty acids. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p.

57, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3213045&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SURMAN, S.; FLEEMAN, L. Continuous glucose monitoring in small animals. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 43, n. 2, p. 381–406, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019556161300003X>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

TAGHIZADEH, M. et al. A randomized-controlled clinical trial investigating the effect of omega-3 fatty acids and Vitamin E co-supplementation on markers of insulin metabolism and lipid profiles in gestational diabetes. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 10, n. 2, p. 386–393, 2016. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L608132749%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jacl.2015.12.017>>.

TEIXEIRA, F. A. **Efeitos do emprego de amido resistente decorrente do processo de extrusão no controle glicêmico de cães diabéticos**. 2016. Universidade de São Paulo, 2016.

TEIXEIRA, F. A. et al. Effects of pea with barley and less-processed maize on glycaemic control in diabetic dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. 7, p. 777–786, 2018. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/effects-of-pea-with-barley-and-lessprocessed-maize-on-glycaemic-control-in-diabetic-dogs/C8422813ED18AFC2DA46C7DC7AC1610D>>.

TEIXEIRA, F. A. et al. Starch sources influence lipidaemia of diabetic dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 2, 3 dez. 2020. Disponível em: <<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-2224-y>>. Acesso em: 14 jan. 2020.

TESHIMA, E. **Efeito da fonte de amido e do manejo alimentar no controle da glicemia em cães com diabetes mellitus naturalmente adquirida**. 2010. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, 2010.

THIFAUULT, E. et al. Effects of age, sex, body mass index and APOE genotype on cardiovascular biomarker response to an n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 6, n. 2, p. 73–82, 2013.

THOMPSON, B.; AMOROSO, L. **Improving diets and nutrition: food-based approaches**. [s.l.: s.n.]

TOTH, P. P.; DAYSPRING, T. D.; POKRYWKA, G. S. Drug therapy for hypertriglyceridemia: fibrates and omega-3 fatty acids. **Current atherosclerosis reports**, v. 11, n. 1, p. 71–79, 2009.

TSUKAGOSHI, T. et al. Decreased gallbladder emptying in dogs with biliary sludge or gallbladder mucocele. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 53, n. 1, p. 84–91, 1 jan. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1740-8261.2011.01868.x>>. Acesso em: 1 ago. 2017.



TSUTSUMI, K.; HAGI, A.; INOUE, Y. The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 24, n. 5, p. 579–581, 2001.

USUI, S.; YASUDA, H.; KOKETSU, Y. Lipoprotein cholesterol and triglyceride concentrations associated with dog body condition score; effect of recommended fasting duration on sample concentrations in Japanese private clinics. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 9, p. 1063–1069, 2015.

WALTER, R. et al. Nonsurgical resolution of gallbladder mucocele in two dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 11, p. 1688–1693, 1 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18518811>>. Acesso em: 6 set. 2017.

WASHABAU, R. J. Integration of gastrointestinal function. In: WASHABAU, R. J.; DAY, M. J. (Ed.). **Canine and Feline Gastroenterology**. 1. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2013. p. 1–31.

WATANABE, N.; GIMBEL, N. S.; JOHNSTON, C. G. Effect of Polyunsaturated and Saturated Fatty Acids on the Cholesterol Holding Capacity of Human Bile. **Archives of Surgery**, v. 85, n. 1, p. 136–141, 1962.

WATSON, T. D. G. Lipoprotein metabolism in dogs and cats. **Comparative Haematology International**, v. 6, n. 1, p. 17–23, 1996.

WATSON, T. D. G.; BARRIE, J. Lipoprotein metabolism and hyperlipidaemia in the dog and cat: A review. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, p. 479–487, 1993.

WATTS, G. F.; KARPE, F. Triglycerides and atherogenic dyslipidaemia: extending treatment beyond statins in the high-risk cardiovascular patient. **Heart**, v. 97, n. 5, p. 350–356, 2011. Disponível em: <<http://heart.bmj.com/content/97/5/350.abstract>>.

WHITNEY, M. S. et al. Ultracentrifugal and Electrophoretic Characteristics of the Plasma Lipoproteins of Miniature Schnauzer Dogs With Idiopathic Hyperlipoproteinemia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 4, p. 253–260, 1993.

WILSON, D. E. et al. Apolipoprotein E-containing lipoproteins and lipoprotein remnants in experimental canine diabetes. **Diabetes**, v. 35, n. 8, p. 933–942, 1986. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/35/8/933>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and The Prevention of Chronic Diseases**. [s.l.: s.n.].v. 916

WRIGHT-RODGERS, A. S. et al. Dietary Fatty Acids Alter Plasma Lipids and Lipoprotein Distributions in Dogs during Gestation, Lactation, and the Perinatal Period. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 9, p. 2230–2235, 2005.

XENOULIS, P. G. et al. Serum liver enzyme activities in healthy Miniature Schnauzers with and without hypertriglyceridemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 1, p. 63–67, 2008. Disponível em:

<papers2://publication/uuid/B38280B3-C6BD-4B89-8FFA-5DC52F8B4DE6>.

XENOULIS, P. G. et al. Serum Triglyceride Concentrations in Miniature Schnauzers with and without a History of Probable Pancreatitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 20–25, 2011a.

XENOULIS, P. G. et al. Association of hypertriglyceridemia with insulin resistance in healthy Miniature Schnauzers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 8, p. 1011–1016, 2011b. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.238.8.1011>>.

XENOULIS, P. G. et al. Novel lipoprotein density profiling in healthy dogs of various breeds, healthy miniature schnauzers, and miniature schnauzers with hyperlipidemia. **BMC Veterinary Research**, v. 9, 2013.

XENOULIS, P. G. The association between hyperlipidemia and gall bladder mucoceles in dogs. **Veterinary Journal**, v. 200, n. 3, p. 353–354, 2014.

XENOULIS, P. G. et al. Serum triglyceride and cholesterol concentrations and lipoprotein profiles in dogs with naturally occurring pancreatitis and healthy control dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2020.

XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. **Veterinary Journal**, v. 183, n. 1, p. 12–21, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.10.011>>.

XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M. Canine hyperlipidaemia. **The Journal of small animal practice**, v. 56, n. 10, p. 595–605, out. 2015.

YILMAZ, Z.; SENTURK, S. Characterisation of lipid profiles in dogs with parvoviral enteritis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 11, p. 643–650, 2007.

YOUN, G. et al. Outcome of elective cholecystectomy for the treatment of gallbladder disease in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 252, n. 8, p. 970–975, 2018.

ZHENG, J.-S. et al. Effects of n-3 fatty acid supplements on glycemic traits in Chinese type 2 diabetic patients: A double-blind randomized controlled trial. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 10, p. 2176–2184, 1 out. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201600230>>. Acesso em: 6 set. 2017.

ZICKER, S. C. et al. Endocrine disorders. In: HAND, M. S. et al. (Ed.). **Small Animal Clinical Nutrition**. 5. ed. Kansas: Mark Morris Institute, 2010. p. 559–586.