

CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE INSULINA DURANTE AS FASES DO CICLO ESTRAL E EM CADELAS COM PIOMETRA

Rodrigo Volpato^{1*}
Eduardo Trevisol¹
Carlos Renato Freitas Guaitolini¹
Ana Augusta Pagnano Derussi¹
Priscilla Nascimento Guasti¹
Diego Gouvêa de Souza¹
Maria Denise Lopes²
Eunice Oba²

RESUMO

As diferentes fases do ciclo estral, assim como processos infecciosos e inflamatórios, interferem na concentração de insulina nas cadelas. A baixa ação da insulina predispõe as cadelas a desenvolver *Diabete mellitus*. A piometra é uma das condições patológicas mais comuns do trato reprodutivo das fêmeas e a *Diabete mellitus* uma das doenças endócrinas mais comuns na clínica de pequenos animais. O objetivo deste estudo foi verificar o impacto do ciclo estral e da piometra sobre os índices de sensibilidade a insulina. As cadelas foram divididas em 5 grupos (pró-estro, estro, diestro, piometra aberta e piometra fechada) e realizou-se a dosagem sérica de insulina e comparação entre as médias. Os resultados mostraram diferenças significativas entre as fases de proestro e diestro quando comparadas as cadelas com piometra. O desenvolvimento da *Diabete mellitus* parece ser multifatorial e fazem-se necessários novos estudos para esclarecer essa interação imuno-endócrina.

Palavras-chave: endocrinologia, diabetes mellitus, ciclo estral, piometra, cão

SERUM INSULIN CONCENTRATION DURING PHASES OF THE ESTROUS CYCLE AND IN PYOMETRA BITCHES

ABSTRACT

The different phases of the estrous cycle, as well as infectious and inflammatory processes, interfere with insulin concentration in dogs. The low action of insulin predisposes dogs to develop diabetes mellitus. The pyometra is one of the most common pathological conditions of the female reproductive tract and diabetes mellitus of the most common endocrine diseases in small animal clinic. The objective of this study was to determine the impact of the estrous cycle and pyometra in the rates of insulin sensitivity. The bitches were divided into five groups (pro-estrus, estrus, diestrus, piometra open and pyometra closed) and held on serum insulin and comparing the means. The results demonstrated significant differences between the proestrus and diestrus stages when compared to bitches with pyometra. The development

¹ Doutorando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Campus Botucatu

* Distrito de Rubião Junior s/n, Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, CEP: 18618-000. Botucatu/SP. Fone/Fax: (014) 6802-6249 / 6802-6326. rodrigo.volpato@hotmail.com

² Profa. Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Campus Botucatu

of diabetes mellitus appears to be multifactorial and it is necessary to do further studies to clarify this immune-endocrine interaction

Key words: endocrinology, diabetes mellitus, estrous cycle, pyometra, dog

CONCENTRACION SÉRICA DE INSULINA DURANTE LAS FASES DEL CICLO ESTRAL Y EN PERRAS CON PIOMETRA

RESUMEN

Las diferentes fases del ciclo estral, así como procesos infecciosos e inflamatorios, pueden interferir en la concentración de insulina en las perras. La baja acción de la insulina predispone a las perras para desarrollar Diabetes mellitus. La piometra es una de las patologías más frecuentes del tracto reproductivo de las hembras y la Diabetes mellitus de las enfermedades endocrinas más frecuentes en la clínica de pequeños animales. El objetivo de este estudio fue determinar el impacto del ciclo estral y piometra en las tasas de sensibilidad a la insulina. Las perras se dividieron en cinco grupos (proestro, estro, diestro, piometra abierta y piometra cerrada) y se analizó la concentración sérica de insulina y comparación de los promedios. Los resultados han demostrado diferencias significativas entre las etapas de proestro y diestro en comparación con las perras con piometra. El desarrollo de Diabetes mellitus parece ser multifactorial y son necesarios más estudios para aclarar esta interacción inmune endócrino.

Palabras clave: endocrinología, diabete mellitus, ciclo estral, piometra, perro

INTRODUÇÃO

A ocorrência do estro e diestro em fêmeas caninas está associada a presença de resistência a concentração de insulina. Além disso, estados sépticos e inflamatórios, como observado frente a piometra, também interferem na resistência a ação insulínica (1). Recentemente, estudos demonstraram que a ocorrência do estro, diestro e da piometra em cães pode prejudicar a atividade tirosina quinase de membrana no tecido muscular, além de reduzir a afinidade da ligação entre a insulina e o seu receptor neste tecido (2).

A piometra é uma enfermidade da cadela adulta caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudato, que ocorre na fase lútea do ciclo estral, de quatro semanas a quatro meses após o estro. No diestro ocorre uma hipertrofia/hiperplasia do endométrio, estimulado pela progesterona e, subsequentemente uma invasão bacteriana. Trata-se de uma das condições patológicas mais comumente encontrada no trato genital das fêmeas caninas (3,4).

A *Diabete mellitus* canina é uma das doenças endócrinas mais comuns na clínica de pequenos animais e nas últimas décadas observou-se aumento na prevalência hospitalar de casos deste transtorno. Esta doença afeta entre 0,0005% e 1,5% da população canina e o número dos casos tem aumentado progressivamente (5,6).

Cerca de 70% das fêmeas portadoras de *Diabetes mellitus* desenvolvem a doença durante a fase de diestro (7). A resistência a insulina durante o diestro pode estar associada as elevadas concentrações de progesterona e do hormônio de crescimento, estes são importantes fatores envolvidos na maior predisposição ao desenvolvimento da doença (8). No entanto o desenvolvimento da *Diabete mellitus* durante a fase de diestro parece ser multifatorial (9-11).

A imunoendocrinologia evidenciou uma série de correlações entre o processo inflamatório e os efeitos da insulina (12-14). A interleucina-1 (IL-1) reduz a liberação e a fusão de grânulos secretores de insulina em células β pancreáticas, com decréscimos

preferencial da primeira fase de exocitose, característica da fase pré-diabética no *Diabetes mellitus* tipo I (15). No sistema nervoso central a IL-1 reduz o ponto de ajuste da glicose, favorecendo a captação de glicose pelas células imunes durante a resposta inflamatória (13).

A sinalização da insulina é um processo muito complexo que envolve múltiplos caminhos e cascatas de eventos de fosforilação (16). O primeiro passo para a sinalização de insulina após a ligação do hormônio para a subunidade alfa do receptor de insulina é a indução de uma complexa cascata de fosforilação em tirosina na subunidade beta. Quando fosforilada nestes locais específicos, a subunidade beta inicia uma série de fosforilações em substratos intracelulares. A fosforilação de um substrato sintético como o Poly oligopeptídeos (Glu 4:Tyr 1) fornece uma boa maneira de avaliar a atividade do receptor de insulina em mamíferos (2).

O objetivo deste estudo foi verificar o impacto do ciclo estral e da piometra sobre a concentração sérica da insulina.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas 12 cadelas acompanhadas durante o ciclo estral, divididas em três grupos, proestro, estro e diestro, de acordo com o resultado da concentração sérica de progesterona e citologia vaginal, todas elas participaram nos três grupos. Foi realizada uma coleta de cada cadela no período da manhã para cada fase do ciclo estral, sendo colhido um total de 12 amostras para cada fase. A idade das cadelas variou de 2 a 11 anos, com idade média de 4,5 anos e pesando entre 4 e 32 Kg, com peso médio de 15,4 Kg. Por participarem de outro experimento, as cadelas foram castradas na fase de diestro. Durante a fase de anestro, considerada de repouso reprodutivo, não há alterações hormonais. Outros dois grupos foram formados por cadelas com diagnóstico de piometra, sendo 24 com presença de secreção purulenta, mucopurulenta ou sanguinolenta e seis apresentando piometra de cérvix fechada. O diagnóstico de piometra foi realizado pelo histórico clínico, exames físico e complementares como hemograma e avaliação ultrassonográfica, neste caso as amostras eram coletadas antes do procedimento cirúrgico de ovariectomia, realizado como forma de tratamento. As cadelas apresentavam idades entre 3 e 17 anos, com média de 8,5 anos e pesando entre 3 e 42 Kg, com média de 18 Kg.

Os animais foram atendidos na área de Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP campus Botucatu

O sangue foi colhido por venopunção da veia jugular em frascos sem anticoagulante (Vacuplast® esteril - USA) e levado ao laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres onde foi centrifugado (Centrífuga LS-3 – Celm® - 1700x g) por 10 minutos para obtenção do soro e os tubos identificados com nome, número de registro dos animais e data, sendo armazenado a temperatura de -18°C até o momento da avaliação. As dosagens de insulina e progesterona foram realizadas utilizando kits comerciais em fase sólida (Coat A – Count Diagnostics Products Corporation - CDP, Los Angeles, Califórnia, USA), com leitura por sistema de radioimunoensaio (Packard Cobra II Auto Gamma- GMI Inc. – Minnesota - USA) seguindo-se as instruções do fabricante. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 1,00 e 0,99 respectivamente.

Para fins de interpretação, as análises estatísticas foram realizadas comparando-se as diferenças entre os grupos (pro-estro, estro, diestro, piometra aberta e piometra fechada) por meio de análise de variância de uma via (ANOVA) posteriormente do teste não paramétrico

Kruskal-Wallis, utilizando o programa GraphPad InStat 3.1 para Windows Vista, considerando-se significativa uma diferença entre médias com $p < 0,05$.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as médias e o erro padrão da concentração de insulina dos grupos estudados durante o ciclo estral e nas cadelas com piometra. Não houve diferença significativa entre o grupo piometra aberta e fechada. Nas diferentes fases do ciclo estral também não foram observadas diferenças significativas nos valores da insulina basal. No entanto, as cadelas com piometra apresentaram valores médios inferiores aos observados nas fases de pró-estro e diestro.

Tabela 1. Valores médios basais de insulina (ng/ml) e erro padrão dos grupos pró-estro, estro, diestro, piometra aberta (PA) e piometra fechada (PF).

Grupos	Médias \pm Erro Padrão
Pró-estro	4,81 \pm 1,148 ^a
Estro	4,24 \pm 1,279
Diestro	3,54 \pm 0,626 ^b
PA	1,80 \pm 0,400
PF	1,01 \pm 0,181

^a representa a diferença ($P < 0,01$) entre o grupo pró-estro comparado a PA e PF; ^b diferença ($p < 0,05$) entre o grupo diestro comparado PA e PF.

DISCUSSÃO

Cerca de 70% dos casos de *Diabete mellitus* em cães ocorreram em fêmeas, sendo que na maioria dos casos observou-se que o início da doença está associado ao período de diestro (7).

Estudos dos receptores de insulina no tecido muscular esquelético de fêmeas caninas evidenciaram que a ocorrência das fases do ciclo estral interfere nos mecanismos fisiológicos de sinalização da insulina. Menor atividade tirosina quinase, pode estar associada a menor ativação do receptor, no entanto, o tecido muscular responde a esta menor sensibilidade com aumento na capacidade total de ligação a insulina, motivo pelo qual não se observaram alterações marcantes na glicemia durante um desafio com glicose em um teste de tolerância intravenoso (2).

No presente estudo não observou-se diferenças significativas na dosagem de insulina em cadelas nas diferentes fases do ciclo estral, corroborando com outros trabalhos (1). Contudo, inúmeros trabalhos indicaram a resistência a concentração de insulina durante o diestro (7,10,17-20).

Classicamente, a resistência a insulina observada durante o diestro foi atribuída aos efeitos diretos da progesterona sobre a sensibilidade a insulina e liberação de hormônio de crescimento (GH) pela glândula mamária estimulada pela progesterona. Apesar disso, alguns autores consideram que o diestro não é suficiente para promover diabetes em cães, mas que a progesterona poderia induzir a diabetes especialmente se há outros fatores de risco associados (7,11,21). Em nosso estudo a fase de diestro apresentou uma dosagem sérica menor que os grupos de piometra, mas não se diferiu quando comparada as outras fases do ciclo estral.

Durante uma resposta inflamatória aguda, ocorreram alterações metabólicas de forma a permitir maior aporte de nutrientes para o sistema imunológico, neste quesito, a presença de

um estado de resistência a insulina moderada promove menor captação de glicose pelo tecido muscular e adiposo. Citocinas pró inflamatórias como a IL-1, IL-6, TNF- α são responsáveis pelo aumento nos lipídios, estimulando a gliconeogênese e a produção de hormônios diabetogênicos e reduzem a sensibilidade a insulina (12,22).

As cadelas com piometra, neste estudo, apresentaram dosagens de insulina menor do que as cadelas em pró-estro e diestro e não se diferiram significativamente das cadelas em estro. Esses resultados diferem de alguns estudos em que cadelas com piometra apresentando insulinemia superior as cadelas em diestro, indicando um estado de resistência a insulina. Não houve padronização na alimentação das cadelas com piometra. Esta patologia é de caráter emergencial e tem como conduta, na maioria das vezes, a intervenção cirúrgica. Este fato pode ter interferência na dosagem da insulina nestes grupos (1).

Durante o estro, diestro e na piometra existe baixa capacidade de ligação de insulina demonstrada na resistência a insulina no tecido muscular de cadelas. No entanto, as cadelas em estro e diestro são capazes de compensar esta situação aumentando a capacidade total de ligação a insulina, não sendo observado nos casos de piometra (2). A resistência a insulina promovida pela piometra é acompanhada de maior atividade das células beta pancreáticas, resultando em maior insulinemia (23). Os grupos piometras em nosso estudo apresentaram dosagens séricas de insulina menores quando comparados aos outros grupos formados pelas diferentes fases do ciclo estral.

CONCLUSÃO

A importância de eventos relacionados ao receptor de insulina ou eventos pós-receptor no desenvolvimento da *Diabete mellitus* canina ainda são pouco conhecidos.

A piometra demonstrou ter as menores concentrações de insulina em relação as fases do ciclo estral. Um novo campo de investigação foi aberto sobre os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do diabetes em cães e novos experimentos e análises permitirão esclarecer esta interação imuno-endócrina.

REFERÊNCIAS

1. Poppl AG, Lasta C, Diaz Gonzalez FH, Kucharski LCR, Silva RSM. Índices de sensibilidade à insulina em fêmeas caninas: efeito do ciclo estral e da piometra. *Acta Sci Vet.* 2009;37:361-70.
2. Poppl AG, Valle SC, Beck CAC, Diaz Gonzalez FH, Kucharski LCR, Silva RSM. Effect of estrus cycle and pyometra on insulin receptor tyrosine quinase activity and insulin receptor binding in female dogs. *Clin Vet.* 2009;14:136-8.
3. Smith FO. Canine pyometra. *Theriogenology.* 2006;66:610-2.
4. Pretzer SD. Clinical presentation of canine piometra and mucometra: a review. *Theriogenology.* 2008;70:359-63.
5. Guptill L, Glickmam L, Glickman N. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records. *Vet J.* 2003;165:240-7.
6. Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? *Diabetologia.* 2005;48:1948-56.

7. Poppl AG, Diaz Gonzalez FH. Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. *Acta Sci Vet.* 2005;33:33-40.
8. Poppl AG, Souza FE, Neves KS, Beck CAC, Leal JS, Driemeier D, et al. Influência do complexo hiperplasia endometrial cística – piometra na sensibilidade periférica à insulina e predisposição à diabetes mellitus: resultados preliminares. *Acta Sci Vet.* 2007;35:465-7.
9. Rijnberk A, Kooitra HS, Mol JA. Endocrine diseases in dogs and cats: similarities and differences with endocrine diseases in humans. *Growth Horm IGF Res.* 2003;13:158-64.
10. Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, Rijnberk A. Progestin treatment in the dog. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor and glucose homeostasis. *Eur J Endocrinol.* 1994;131:413-21.
11. Scaramal JD, Renauld A, Gomez NV, Garrido D, Wanke MM, Maequez AG. Natural estrous cycle in normal and diabetic bitches in relation to glucose and insulin tests. *Medicina (B Aires).* 1997;57:169-80.
12. Grimble RF. Inflammatory status and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5:551-9.
13. Del Rey A, Roggero E, Randolph A, Mahuad C, Mccann S, Rettori V, et al. IL-1 resets glucose homeostasis at central levels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;3:16039-44.
14. He J, Usui I, Ishizuka K, Kanatani Y, Hiratani K, Iwata M, et al. Interleukin-1 β inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2006;20:114-24.
15. Ohara-Imaizumi M, Cardozo AK, Kikuta T, Eizirik DL, Nagamatsu S. The Cytokine Interleukin-1 α reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic β -cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. *J Biol Chem.* 2004;279:41271-4.
16. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obesity.* 2003;27:53-5.
17. Poppl AG, Mottin TS, Dias CB, Breitsmater I, Beck CAC, Lasta C, et al. Estudo preliminar da ligação hormônio-receptor da insulina em membranas de músculo e da tolerância à glicose em fêmeas caninas durante o ciclo estral. *Acta Sci Vet.* 2007;35:462-4.
18. Eingenmann JE, Eingenmann RY, Rijnberk A, Gaag I, Zapf J, Froesch ER. Progesterona-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. *Acta Endocrinol.* 1983;104:167-76.
19. Batista M, Smith MS, Snead WL, Connolly CC, Lacy DB, Moore MC. Chronic estradiol and progesterone treatment in conscious dogs: effects on insulin sensitivity and response to hypoglycemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:1064-73.
20. Johnson CA. Glucose homeostasis during canine pregnancy: insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. *Theriogenology.* 2008;70:1418-23.
21. Hoenig M. Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;197:221-9.

22. Das UN. Insulin in sepsis and septic shock. J Assoc Phys India. 2003;51:695-700.
23. Matthews D, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting glucose and insulina concentrations in man. Diabetologia. 1985;28:412-9.

Recebido em: 04/10/11

Aceito em: 01/02/12