

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS
EM CÃES SAUDÁVEIS SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPOS DE
JEJUM**

RAFAELA BRUNO FARIA PISANI

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS
EM CÃES SAUDÁVEIS SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPOS DE
JEJUM**

RAFAELA BRUNO FARIA PISANI

Sob a Orientação do Professor

Júlio Israel Fernandes

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia e Ciências Clínicas, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Ciências Clínicas e Patologia Veterinária

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

PP674a Pisani, Rafaela Bruno Faria , 1990-
a Avaliação dos níveis de Colesterol e Triglicerídeos
em cães saudáveis submetidos a diferentes tempos de
jejum / Rafaela Bruno Faria Pisani. - 2017.
70 f.: il.

Orientador: Júlio Israel Fernandes .
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Curso de Pós Graduação em Medicina
Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), 2017.

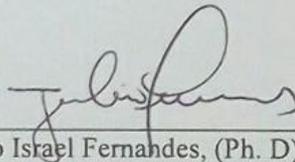
1. Metabolismo Lipídico. 2. Jejum Alimentar . 3.
Dislipidemia . 4. Beagles. I. Israel Fernandes ,
Júlio , 1979-, orient. II Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Curso de Pós Graduação em Medicina
Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

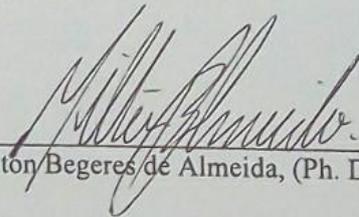
RAFAELA BRUNO FARIA PISANO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências
Clínicas.

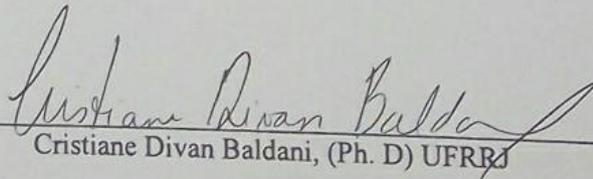
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16/02/2017



Julio Israel Fernandes, (Ph. D) UFRRJ
(orientador)



Milton Begeres de Almeida, (Ph. D) UFPA



Cristiane Divan Baldani, (Ph. D) UFRRJ

Aos meus pais pelo apoio incondicional que me deram em todos os momentos da minha vida, a meu marido Vinícius por existir e fazer parte dessa conquista, e por todo apoio e paciência e a todos que de alguma forma me apoiaram nesta batalha.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades oferecidas, saúde e força para que pudesse concluir o mestrado, caminho árduo, porém vitorioso.

Ao meu marido Vinícius Ribeiro Machado da Silva por sua presença em minha vida, me apoiando, incentivando, motivando e ajudando na elaboração e conclusão desta dissertação.

Aos meus pais, por toda ajuda e apoio, sempre me incentivando ao crescimento profissional.

Ao Professor Dr. Júlio Israel Fernandes, pela orientação, pelo carinho, pela paciência e ajuda nas horas difíceis, pelo incentivo ao término deste mestrado e motivador para seguimento na área acadêmica.

Ao Professor Dr. Fábio Barbour Scott, por possibilitar a realização deste experimento e por todos os momentos de aprendizado durante o período.

À Mv. Priscila Cardim, por todo o apoio, ajuda e companheirismo na execução deste experimento e aos atendimentos no setor de Endocrinologia no Hospital Veterinário de Pequenos Animais.

À Mv. Monique Moraes Lambert, ao Mv. Diefrey Campos e à discente Isabela Pessôa, por toda ajuda oferecida permitindo a execução deste experimento, e por todos os momentos vividos durante o período acadêmico.

Às amigas Mvs. Marcela Folha, Elisa Pádua e Carolina Moraes, por todo companheirismo, acolhimento e apoio oferecido durante o Mestrado.

A todos os demais colegas e estagiários do laboratório LQEPV do Prof. Fábio Scott, pelo suporte oferecido sempre que necessário.

Aos colegas de turma do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela constante troca de informações.

Aos Técnicos do laboratório do Prof. Fábio Scott pelos cuidados prestados aos animais deste experimento.

RESUMO

PISANI, Rafaela Bruno Faria. **Avaliação dos níveis de colesterol e triglicerídeos em cães saudáveis submetidos a diferentes tempos de jejum.** 2017. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A dislipidemia é uma condição importante emergente nos cães da atualidade e é consequência do aumento na ingestão de gorduras alimentares ou decorrente de distúrbios endógenos no metabolismo lipídico. Tem sido considerada uma condição relativamente benigna na maioria dos casos, mas, evidências científicas sugerem que pode preceder doenças de importância clínica como pancreatite, resistência insulínica, e doença hepatobiliar. Seu correto diagnóstico é realizado através da dosagem de triglicerídeos e colesterol séricos com jejum alimentar adequado. O objetivo do trabalho foi avaliar a relação entre os diferentes tempos de jejum alimentar e análise da dosagem dos níveis de colesterol e triglicerídeos, uma vez que os tempos de jejum determinados para avaliação desses parâmetros, são baseados em estudos na espécie humana e erros na interpretação são comumente realizados. Foram utilizados 28 cães (14 machos e 16 fêmeas) oriundos do canil de Beagles do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) saudáveis (não obesos) com idades entre 1 a 6 anos e inteiros (não castrado). Foram coletadas amostras de sangue para análise de colesterol e triglicerídeos a cada 2 horas, iniciando com jejum alimentar de 6 horas e terminando com 16 horas. Não houve diferenças significativas na interpretação do tempo de coleta entre machos e fêmeas, logo possuem interpretações diferentes. O tempo de jejum indicado para avaliação de colesterol em fêmeas saudáveis foi de 10 horas, enquanto em machos 12 horas. Já para avaliação de triglicerídeos, o tempo de jejum indicado nas fêmeas foi de 14 horas e em machos deve ser a partir de 16 horas, considerando uma frequência de alimentação a cada 24 horas. Os valores médios de colesterol total com jejum de 6,8,10,12,14 e 16 horas, foi maior em fêmeas (179,6; 180,1;164,9; 162,5; 162,2; 162,5 mg/dL) do que em machos (165,1; 158,7; 146; 142,5; 140,5; 144,7 mg/dL) respectivamente, do mesmo modo, os valores de triglicerídeos com jejum de 6,8,10,12,14 e 16 horas, também foram maiores em fêmeas (176,7; 131,9; 91,5; 73,7; 50,7; 52,1; mg/dL) do que em machos (106,4; 72,6; 56,8; 44,8; 45,8; 37,6;mg/dL) respectivamente.

Palavras-chave: metabolismo lipídico, jejum alimentar, dislipidemia

ABSTRACT

PISANI, Rafaela Bruno Faria. **Evaluation of cholesterol and triglyceride levels in healthy dogs submitted to different fasting times.** 2017. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Medicine). Institute of Veterinary Medicine. Department of Medicine and Veterinary Surgery. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Dyslipidemia is an important condition emerging in dogs today and is a consequence of the increase in dietary fat intake or due to endogenous disorders in lipid metabolism. It has been considered a relatively benign condition in most cases, but scientific evidence suggests that it may precede diseases of clinical importance such as pancreatitis, insulin resistance, and hepatobiliary disease. Its correct diagnosis is made through the dosage of serum triglycerides and cholesterol with adequate food fasting. The objective of this study was to evaluate the relationship between the different fasting times of food and analysis of the levels of cholesterol and triglycerides levels, since the fasting times determined for the evaluation of these parameters are based on studies in the human species and errors in the interpretation are commonly performed. Twenty-eight dogs (14 males and 16 females) from the Beagles kennel of the Laboratory of Experimental Chemotherapy in Veterinary Parasitology (LQEPV), healthy (non-obese), aged 1 to 6 years and intact (not castrated) were used. Blood samples were collected for analysis of cholesterol and triglycerides every 2 hours, starting with a 6-hour fasting and ending with 16 hours. It was concluded that there are significant differences in the interpretation of collection time between males and females, so they have different interpretations. The fasting time indicated for evaluation of cholesterol in healthy females was 10 hours, while in males 12 hours. For the evaluation of triglycerides, the fasting time indicated in females was 14 hours and in males should be from 16 hours, considering a frequency of feeding every 24 hours. The mean values of fasting total cholesterol of 6,8,10,12,14 and 16 hours were higher in females (179.6, 180.1, 164.9, 162.5, 162.2, 162.5 mg/dL) than in males (165.1, 158.7, 146, 142.5, 140.5, 144.7 mg/dL), similarly fasting triglyceride values of 6, 8,10,12,14 and 16 hours were also higher in females (176.7, 131.9, 91.5, 73.7, 50.7, 52.1, mg/dL) than in males (106.4, 72.6, 56.8, 44.8, 45.8, 37.6, mg/dL) respectively.

Key words: lipid metabolism, fasting food, dyslipidemia

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

AGCL - cidos Graxos de Cadeia Longa

VLDL - Very Low-Density Lipoprotein

LDL - Low-Density Lipoprotein

HDL – Hight- Density Lipoprotein

Apo E – Apolipoproteína tipo E

Apo C – Apoprotena tipo C

CETP - Cholesteryl Ester Transfer Protein

NEFA - cidos Graxos Não Esterificados

NPP - Nefropatia Perdedora de Proteínas

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

LQEPV - Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária

COV – Coeficiente de VariaoAGCL - cidos Graxos de Cadeia Longa

VLDL - Very Low-Density Lipoprotein

LDL - Low-Density Lipoprotein

HDL – Hight- Density Lipoprotein

Apo E – Apolipoproteína tipo E

Apo C – Apoprotena tipo C

CETP - Cholesteryl Ester Transfer Protein

NEFA - cidos Graxos Não Esterificados

NPP - Nefropatia Perdedora de Proteínas

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

LQEPV - Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária

COV – Coeficiente de Variação

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Molécula de Triglicerídeo (TRHALL et al. 2007).....	15
Figura 2. Molécula de Colesterol (TRHALL et al. 2007).	17
Figura 3. Ilustração esquemática de conceitos básicos do metabolismo de lipoproteínas em cães (Adaptado de XENOULIS et al., 2015).....	19
Figura 4. Formação de camada semelhante a creme no topo de uma amostra, indica a presença dos quilomícrons (esquerda). A falha na separação da amostra, indica a presença de VLDL (meio). As amostras normais são claras (direita). Fonte: THRALL et al., 2012.....	26
Figura 5. Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro– A) Canis Coletivos; B) Canis Individuais.	34
Figura 6. Canil individualizado de alvenaria. (Com aviso de não alimentar)	36
Figura 7. Delineamento experimental para mensuração de triglicerídeos e colesterol em cães da raça Beagle com diferentes intervalos de tempo.	37
Figura 8. Coleta de sangue com Vaccuteiner para obtenção de amostra sanguínea.	37
Figura 9. Gráfico box-plot que apresenta a distribuição dos dados do colesterol das fêmeas para cada tempo de jejum realizado.	42
Figura 10. Gráfico box-plot que apresenta a distribuição dos dados do colesterol dos machos para cada tempo de jejum realizado	42
Figura 11. Comportamento da média do colesterol para cada tempo de coleta de todos os animais, apenas fêmeas e apenas machos.....	43
Figura 12. Comportamento do coeficiente de variação do colesterol para cada tempo de coleta de todos os animais, apenas fêmeas e apenas machos.....	44
Figura 13. Gráfico de probabilidade normal aplicado ao grupo de fêmeas.....	46
Figura 14. Gráfico de probabilidade normal aplicado ao grupo de machos.....	46
Figura 15. Gráfico box-plot que apresenta a distribuição dos dados do triglicerídeo das fêmeas para cada tempo de jejum realizado	52
Figura 16. Gráfico box-plot que apresenta a distribuição dos dados do triglicerídeo das machos para cada tempo de jejum realizado	52
Figura 17. Comportamento da média do triglicerídeo para cada tempo de coleta de todos os animais, apenas fêmeas e apenas machos.....	53
Figura 18. Comportamento do coeficiente de variação do triglicerídeo para cada tempo de coleta de todos os animais, apenas fêmeas e apenas machos	54
Figura 19. Gráfico de probabilidade normal aplicado ao grupo de fêmeas.....	55
Figura 20. Gráfico de probabilidade normal aplicado ao grupo de machos.....	56

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Análise Individual dos valores de colesterol obtidos em cães da raça Beagle submetidos a diferentes tempos de jejum. (Volor de Referência: 135 a 270mg/dL de acordo com KANEKO et al., 2008).	40
Tabela 2. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de colesterol para o grupo total de animais (machos e fêmeas).....	41
Tabela 3. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de colesterol para o grupo total de animais (machos e fêmeas).....	44
Tabela 4. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de colesterol para o grupo de fêmeas.....	45
Tabela 5. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de colesterol para o grupo de machos.....	45
Tabela 6. Teste Mann-Whitney para avaliar a diferença das médias do colesterol entre os grupos dos machos e fêmeas	47
Tabela 7. Teste estatístico t-student para avaliar a diferença das médias entre os tempos de coleta do colesterol no grupo fêmeas	48
Tabela 8. Teste estatístico Wilcoxon pareado para avaliar a diferença das médias entre os tempos de coleta do colesterol no grupo machos	48
Tabela 9. Análise individual dos valores de triglicerídeos obtidos em cães da raça Beagle submetidos a diferentes tempos de jejum. Ref.: 20 a 112 mg/dL (KANEKO et al., 2008).	50
Tabela 10. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de triglicerídeos para o grupo total de animais (machos e fêmeas).....	51
Tabela 11. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de triglicerídeos para o grupo de fêmeas.....	54
Tabela 12. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de triglicerídeos para o grupo de machos.....	55
Tabela 13. Teste Mann-Whitney para avaliar a diferença das médias do triglicerídeo entre os grupos dos machos e fêmeas	57
Tabela 14. Teste estatístico Wilcoxon pareado para avaliar a diferença das médias entre os tempos de coleta do triglicerídeo no grupo fêmeas	57
Tabela 15. Teste estatístico Wilcoxon pareado para avaliar a diferença das médias entre os tempos de coleta do triglicerídeo no grupo machos	58

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 COMPOSIÇÃO LIPÍDICA EM CÃES	14
2.1.1 Triglicerídeos	14
2.1.1.1 Mensuração de triglicerídeos em cães	15
2.1.2 Colesterol	16
2.1.2.1 Mensuração de colesterol em cães	17
2.1.3 Outros compostos lipídicos	18
2.2 METABOLISMO LIPÍDICO	19
2.2.1 Via Exógena	19
2.2.2 Via Endógena	20
2.3 AVALIAÇÃO LIPÍDICA E TEMPOS DE JEJUM RECOMENDADOS	22
2.4 HIPERLIPIDEMIA	25
2.4.1 Hiperlipidemia pós-prandial	27
2.4.2 Hiperlipidemia primária	27
2.4.3 Hiperlipidemia secundária	28
2.5 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS DISLIPIDEMIAS	31
2.6 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA DAS DISLIPIDEMIAS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	34
3.2 AVALIAÇÃO PRÉ-EXPERIMENTAL	34
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL EM DIFERENTES TEMPOS DE JEJUM ALIMENTAR	39
4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRIGLICERÍDEOS EM DIFERENTES TEMPOS DE JEJUM ALIMENTAR	50
4.3 AVALIAÇÃO CONJUNTA DE COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS	59
5 CONCLUSÕES	61
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	62
7 ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO

A dislipidemia é um distúrbio no metabolismo de lipídios resultante da síntese aumentada ou degradação reduzida das lipoproteínas responsáveis pelo transporte de colesterol e triglicerídeos séricos. As dislipidemias podem ser primárias, quando associadas a um defeito genético no metabolismo das lipoproteínas como ocorre em algumas raças de cães, ou secundárias a distúrbios endócrinos ou metabólicos, tais como hiperadrenocorticismos, diabetes, hipotireoidismo, obesidade ou ainda pós-prandiais, que possuem ocorrência transitória.

Embora a hiperlipidemia em si pareça não conduzir diretamente para o desenvolvimento de grandes sinais clínicos, tem sido relatado associação com outras doenças que são clinicamente importantes e potencialmente fatais como pancreatite, doença hepatobiliar, resistência insulínica, aterosclerose e doença ocular. Além disso, cães com distúrbios lipídicos tem maior propensão a serem obesos o que diminuiu seu tempo de vida quando comparados aos saudáveis.

O diagnóstico se dá através de dosagens séricas de triglicerídeos e/ou colesterol em jejum alimentar de 12 horas (JOHNSON, 2005), outros autores sugerem jejum alimentar de até 15 horas (XENOULIS, 2015). Não há na literatura veterinária valores específicos para o jejum alimentar no cão, sendo essas recomendações realizadas a partir de estudos em humanos. Há pesquisas que mostram diferenças nos valores de colesterol e triglicerídeos entre raças diferentes, sexos (machos e fêmeas), idades (filhote, adulto e idoso) e perfil reprodutivo (castrado e não castrado) mas, não há estudos que avaliem os diferentes tempos de jejum alimentar para tal avaliação (XENOULIS et al., 2007; USUI et al., 2014; KAWASUMI et al., 2014).

Autores sugerem a inclusão do perfil lipídico em todos os exames bioquímicos com o intuito de avaliar precocemente as dislipidemias. Visto que na clínica veterinária a avaliação do perfil lipídico tem sido incluída na rotina de cães saudáveis, o objetivo deste estudo inclui a avaliação da influência do tempo de jejum alimentar indicado para análise de triglicerídeos e colesterol em cães saudáveis, visto que, o tempo de jejum inadequado (subestimado ou superestimado) pode levar a diagnósticos equivocados e por consequência ao manejo inadequado do tratamento nas dislipidemias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPOSIÇÃO LIPÍDICA EM CÃES

Lipídeos são compostos insolúveis em água (hidrofóbicos) e por isso dependem de proteínas para transpor membranas e exercerem suas funções, principalmente à albumina (BAUER, 2004). As lipoproteínas funcionam como um sistema de transporte para carrear triglicerídeos insolúveis em água e colesterol através do plasma sanguíneo. São complexos compostos de proteínas, e possuem um núcleo central de triglicerídeos e colesterol circundado por uma camada superficial composto de fosfolipídio, apolipoproteínas e colesterol. Levam os lipídeos para serem metabolizados em tecidos-alvo e exercem sua função através de receptores específicos celulares (NELSON; ELLIOT, 2010).

Devido a essa insolubilidade em água, não são capazes de gerar força osmótica o que em partes, parece ser benéfico à estocagem de energia, uma vez que grandes quantidades de triglicerídeos podem ser armazenados em tecido adiposo sem ocupar, portanto, espaço e peso (AIRES, 2012).

São essenciais para múltiplas funções metabólicas do organismo animal: compõem membranas celulares, são usados como energia quando estocados em tecidos, além de desempenharem papel de cofatores de enzimas, hormônios e mensageiros intracelulares responsável pela sinalização necessária para diversos mecanismos de produção de energia (KANEKO et al., 2008).

Os triglicerídeos são os mais importantes, no que diz respeito à armazenamento de energia enquanto o colesterol e fosfolipídios são os constituintes mais importantes da membrana lipídica (KANEKO et al., 2008). Além dessas funções, os lipídeos são precursores de hormônios esteroidais e de ácidos biliares (colesterol) (SCOTT; STOCKHAM, 2012).

2.1.1 Triglicerídeos

São as principais formas de armazenamento dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), nos quais são esterificados em glicerol-3-fosfato (Figura 1). Necessitam da ligação às proteínas formando complexos chamados de lipoproteínas para que ocorra o transporte no plasma. De acordo com (KANEKO et al., 2008), a centrifugação imediata de amostras de sangue seguida de análise rápida ou congelamento do plasma evitará níveis de triglicerídeos falsamente baixos.

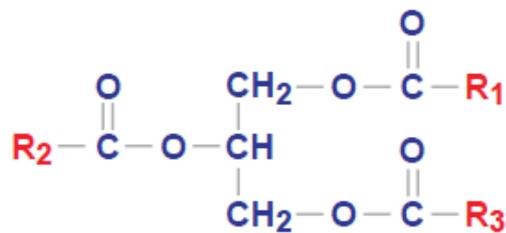


Figura 1. Molécula de Triglicerídeo (TRHALL et al. 2007).

Todas as células podem sintetizar triglicerídeos, porém, fígado, tecido adiposo, glândula mamária e intestino delgado produzem em maior quantidade. Geralmente, circunstâncias fisiológicas ou patológicas, tais como inanição ou diabetes, que promovem níveis plasmáticos elevados de AGCL por incapacidade de utilização pelos tecidos, suprimem a síntese de mais AGCL. Enquanto circunstâncias fisiológicas que promovem a síntese de AGCL, como comer uma refeição rica em carboidratos, inibem a lipólise em tecido adiposo, de modo que os níveis de AGCL no plasma não se elevam (AIRES 2012).

A maior parte dos triglicerídeos sintetizados no fígado normalmente serão incorporados e exportados como parte de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Porém, se a síntese exceder a capacidade de exportação hepática, os triglicerídeos irão se acumular em vesículas nos hepatócitos, levando ao fígado gorduroso (esteatose hepática). Se o triglicerídeo for sintetizado na glândula mamária, as moléculas resultantes se acumularão em vesículas de células secretoras e elas sofrerão extrusão para o lúmen dos ácinos glandulares.

O catabolismo do triacilglicerol envolve a ação de lipases. As principais lipases são: lipase pancreática, lipase hepática, lipase sensível a hormônios do tecido adiposo, lipase de lipoproteína encontrada em células endoteliais e as lipases lisossomais contidas na maioria das células (KANEKO et al., 2008).

2.1.1.1 Mensuração de triglicerídeos em cães

A mensuração está indicada em pacientes com hiperlipidemia ou hipercolesterolemia, especialmente se houver sinais clínicos associados como: sinais gastrointestinais, dor abdominal, convulsões ataxia, obesidade, fraquezas, alterações comportamentais e lipemia retiniana (NELSON, 2012).

Para correta mensuração, alguns autores sugerem que cães tenham jejum alimentar por uma noite ou por cerca de 12 horas para evitar hiperlipidemia pós-prandial fisiológica (SCOTT M; STOCKHAM. 2012; THRALL et al., 2012) enquanto outros sugerem estado de jejum por

apenas 10 horas para a medição (NELSON; ELLIOT, 2010). THRALL (2007) diz que, a hiperlipidemia pós-prandial tem início 1 a 2 horas após a alimentação, atinge o valor máximo em 6 a 8 horas e pode persistir até 16 horas depois da ingestão de alimento que contenha quantidades normais de gordura. O jejum por 12 horas deve permitir tempo suficiente para a depuração da hiperlipidemia em cães.

Os triglicerídeos são mensurados em soro ou plasma de EDTA por métodos espectrofotométricos ou enzimáticos. Os valores de triglicerídeos tendem a ser ligeiramente menores no plasma do que no soro, logo o soro é amostra preferida. É estável à 4°C por 5-7 dias, a -20°C por 3 meses e a -70°C por anos (SCOTT; STOCKHAM, 2012). Descongelamento e congelamento devem ser evitados.

Os métodos enzimáticos podem dar valores ligeiramente maiores do que os métodos espectrofotométricos. Os medidores de triglicerídeos usados em seres humanos podem ser utilizados para identificar hipertrigliceridemia em cães (KLUGER et al., 2010). Concentrações aumentadas de quilomícrons e VLDL podem causar lactescência ou turbidez no soro e interferir em ensaios espectrofotométricos, e na maioria dos ensaios automatizados, a reação inicial envolve uma lipase que libera glicerol de triglicerídeo. O glicerol liberado é então medido em reações acopladas que resultam em produtos que podem ser detectados por espectrofotometria (SCOTT; STOCKHAM, 2012).

Valores normais em cães estão entre 20 a 112mg/dL (KANEKO et al., 2008).

2.1.2 Colesterol

O colesterol pode estar na forma livre ou ser esterificado com ácidos graxos para formar o éster de colesterol (Figura 2). O colesterol é o precursor dos hormônios esteroides, vitamina D, e os ácidos biliares, além de ser um constituinte das membranas celulares e micelas biliares. Pode ser obtido a partir da dieta ricas em produtos de origem animal, ou ainda ser sintetizado de forma endógena. O principal órgão sintético e catabólico para o colesterol é o fígado. Os órgãos endócrinos esteroideogênicos (córtex adrenal, testículo, ovário, placenta) podem sintetizar pequenas quantidades de colesterol, contudo, estes órgãos utilizam colesterol sintetizado no fígado para consumo próprio na produção de hormônios esteroides (AIRES, 2012).

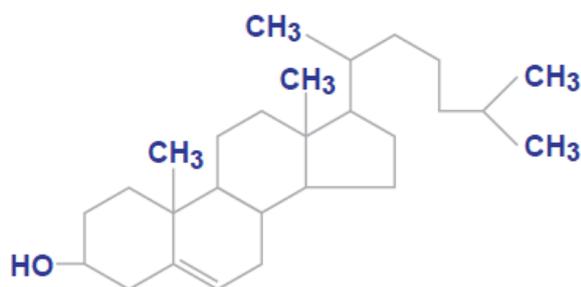


Figura 2. Molécula de Colesterol (TRHALL et al. 2007).

O colesterol puro e os ésteres de colesterol são sólidos brancos cerosos insolúveis e devem ser transportados através do plasma como parte das lipoproteínas. Uma vez que o colesterol foi sintetizado no hepatócito, pode ser segregado no plasma como parte das lipoproteínas (principalmente em VLDL), ser segregado nos canalículos e tornarem-se parte das micelas biliares, ser degradado à ácidos biliares, ou ainda ser esterificado a um ácido graxo de cadeia longa (AGCL). Além disso, os ésteres de colesterol são ainda menos solúveis do que o colesterol e são encontrados em membranas e micelas onde quer que o colesterol seja encontrado (KANEKO et al., 2008).

Os ésteres de colesterol podem ser exportados como parte das lipoproteínas, ou podem ser convertidos de volta ao colesterol mais ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) por hidrolases, que são encontradas no citosol, retículo endoplasmático e lisossomos. A desesterificação é obrigatória antes que o colesterol possa ser catabolizado para ácidos biliares isso ocorre, pois, além de aumentar a capacidade carreadora de lipídios das lipoproteínas, evita-se o efeito tóxico do colesterol livre (KANEKO et al., 2008).

2.1.2.1 Mensuração de colesterol em cães

A mensuração de colesterol no soro está indicada em cães com hiperlipidemia e como triagem para doenças hormonais (hipotireoidismo e hiperadrenocorticismo), insuficiência hepática e enteropatia perdedora de proteína. A hipercolesterolemia por si só não causa lipemia grave (SCOTT; STOCKHAM, 2012).

A concentração sérica de colesterol inclui os ésteres de colesterol que são hidrolisados durante a análise. As moléculas reativas de colesterol estão dentro de lipoproteínas, tipicamente em moléculas de LDL e HDL ricas em colesterol. A concentração de colesterol total é estável a 4°C por 5-7 dias, a -20°C por 3 meses e a -70°C por anos.

Autores sugerem que cães e gatos devam ficar em jejum durante toda a noite ou cerca de 12 horas para evitar a hiperlipidemia pós-prandial, assim como ocorre com triglicérides (SCOTT; STOCKHAM, 2012; THRALL et al., 2012) enquanto outros sugerem estado de jejum por apenas 10 horas para a medição (NELSON; ELLIOT. 2010).

A maioria dos ensaios automatizados consistem em métodos enzimáticos que hidrolisam os ésteres de colesterol e então usam a colesterol-oxidase para oxidar colesterol e gerar peróxido de hidrogênio, que então reage com um corante indicador (SCOTT; STOCKHAM. 2012), porém, outros métodos podem ser utilizados como espectrofotometria, cromatografia e ensaios automatizados sendo esta última umas das técnicas que podem superestimar ligeiramente a concentração de colesterol no soro (KLUGER et al., 2010).

Valores normais de colesterol variam de 135 a 270mg/dL (KANEKO et al., 2008).

2.1.3 Outros compostos lipídicos

As lipoproteínas são grandes conglomerados não celulares (micelas) de lipídios e proteínas, que são suspensos no plasma ou na linfa. Sua principal função é transportar a maioria dos lipídios entre os tecidos. Outra função das lipoproteínas é a esterificação do colesterol. Elas possuem uma estrutura micelar na qual as moléculas menos polares (triacilglicerol e colesterol) ocupam o centro e moléculas mais polares (proteínas e fosfolipídios) cobrem o exterior. As lipoproteínas são sintetizadas quase exclusivamente pelo fígado e pelo intestino delgado.

As principais classes de lipoproteínas são definidas pela sua densidade e determinadas por ultracentrifugação, são elas: quilomícrons (d: 0,94 g/ml), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, d: 0,94 a 1,006 g/ml), lipoproteínas de baixa densidade (LDL, d: 1,006 a 1,063 g/ml) e lipoproteínas de alta densidade (HDL, d: 1,063 a 1,21 g/ml). Menos vulgarmente consideradas são as lipoproteínas de muito alta densidade (VHDL, d: 1,21 g/ml), que são normalmente muito baixas em concentração no plasma (KANEKO et al., 2008).

A medição de lipoproteínas em cães e gatos requer métodos mais sofisticados tais como centrifugação por gradiente de densidade ou eletroforese. Métodos de autoanálise e "*point of care*" destinados a quantificar o colesterol- HDL utilizando técnicas de precipitação e cálculos. Métodos validados para seres humanos não foram validados em espécies veterinárias. Como resultado, as análises de lipoproteínas não são rotineiramente medidas em medicina veterinária e, deve-se exigir o envio de amostras para laboratórios especializados de referência que possuam a validação no método de seu laboratório (THRALL et al., 2012).

2.2 METABOLISMO LIPÍDICO

O metabolismo lipídico, composto pela digestão e absorção, pode ser dividido em duas vias básicas de acordo com (BAUER, 2004): através da alimentação (Exógena) ou do próprio metabolismo lipídico no organismo (Endógena) (Figura 3).

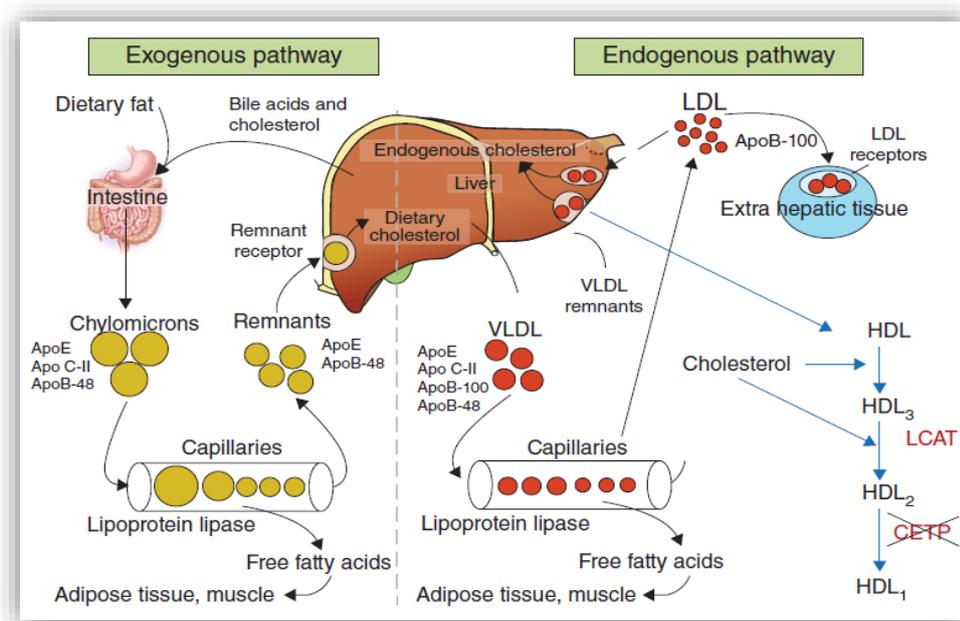


Figura 3. Ilustração esquemática de conceitos básicos do metabolismo de lipoproteínas em cães (Adaptado de XENOULIS et al., 2015).

2.2.1 Via Exógena

A digestão de lipídeos é mais complexa do que a digestão de carboidratos ou proteínas pelo fato de serem hidrofóbicos e precisarem ser metabolizados na água do quimo gástrico para que ocorra a digestão enzimática. O principal local para digestão e absorção dos alimentos que contenham triglicerídeos, é o intestino delgado, e a principal enzima envolvida é a lipase pancreática. O pâncreas fornece lipases para atacar triglicerídeos além de fornecer também, colesterol esterases para hidrólise de ésteres de colesterol e fosfolipase do tipo A2 para atacar os fosfolipídios (KANEKO et al., 2008). Para que essas enzimas sejam eficazes, primeiramente deve ocorrer emulsificação dos lipídeos pela bile.

A bile contém micelas compostas principalmente de ácidos biliares, fosfolipídios e colesterol. Para que as enzimas possam atacar a superfície externa, as gorduras nos alimentos se tornam parte integrante dessas micelas. Os ácidos graxos, monoacilgliceróis e colesterol resultantes do ataque das enzimas tornam-se parte dos lipídeos da borda em escova das células

intestinais. Nos enterócitos, os ácidos graxos, gliceróis e colesterol são reempacotados em triglicerídeos e são então ligados às apolipoproteínas para formar os Quilomícrons (GUYTON; HALL, 2000; KANEKO et al., 2008)

Enquanto os quilomícrons são responsáveis por transportar os lipídeos da dieta (exógena), outras lipoproteínas como VLDL (very low-density lipoprotein), LDL (low-density lipoprotein) e HDL (high-density lipoprotein) são principalmente envolvidos no metabolismo dos lipídeos produzidos endogenamente (BAUER, 1996). Elas se diferem de acordo com sua densidade de flutuação na ultracentrifugação sendo a densidade de flutuação inversamente proporcional ao conteúdo de triglicerídeos, de modo que os quilomícrons são compostos por triglicerídeos, ao passo que o HDL virtualmente quase não contém triglicerídeo (NELSON; ELLIOT, 2010).

Os quilomícrons são compostos principalmente por triglicerídeos e após sua formação nos enterócitos seguem via linfática em seguida via sanguínea onde adquirem ligantes específicos chamados de apolipoproteínas (Apo E, Apo C) a partir de HDL (RIFAI et al., 1999; BAUER, 2004). Há ativação de lipoproteínas lipases, pela apolipoproteína C-II exposta sobre a superfície do quilomícron, que são encontradas nos capilares sanguíneos de tecido adiposo e músculo esquelético que hidrolisam triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol que serão utilizados para produção de energia em tecidos alvo como nas células musculares e/ou adipócitos. A atividade das lipoproteínas lipases é influenciada por diversos fatores, tais como heparina, insulina, glucagon e hormônio tireoidiano (NELSON; ELLIOT, 2010).

As partículas restantes ricas em colesterol retornam sua molécula (a partir de apo C-II) para HDL e são reconhecidos por receptores específicos (apo E) no fígado onde rapidamente são removidas circulação por endocitose. O colesterol encontrado nos quilomícrons remanescentes podem ainda ser utilizados para a lipoproteína VLDL e/ou formação de ácido biliar ou armazenados em ésteres de colesterol (BAUER, 1995). Os quilomícrons estão presentes no plasma de 30 minutos a 2 horas após uma alimentação gordurosa, e a hidrólise é normalmente completada dentro de 6 a 10 horas (NELSON; ELLIOT, 2010).

2.2.2 Via Endógena

O fígado transforma o excesso de ácidos graxos livres, que não foram utilizados pelo organismo, em energia em triglicerídeos. Os ácidos graxos livres podem ser mobilizados do tecido adiposo pela ativação da enzima intracelular lipase hormônio-sensitiva (LHS). A LHS hidrolisa os triglicerídeos estocados em ácidos graxos livre e glicerol. São estimuladas pela

adrenalina, hormônios adrenocorticotróficos (ACTH), corticosteroides, hormônio do crescimento e hormônio tireoideano além da ativação por deficiência insulínica (NELSON; ELLIOT, 2010). A ativação da LSH ocorre em situações de jejum para suprir o organismo com energia durante este período.

Os triglicerídeos produzidos pelos hepatócitos são empacotados nas partículas de VLDL e em seguida secretados na corrente sanguínea. Partículas de VLDL são produzidas continuamente pelo fígado, e são também usadas para retirar o colesterol do fígado possuindo por isso uma proporção significativa de colesterol em sua estrutura. As lipoproteínas lipases presente nos capilares hidrolisam a porção triglicerídea da molécula de VLDL em ácidos graxos que podem ser estocados e oxidados em energia, e glicerol. Alternativamente, uma segunda lipase endotelial, a lipase hepática, pode remover o triglicerídeo residual e converter a partícula de VLDL remanescente em uma partícula de LDL (JOHNSON, 2005; NELSON; ELLIOT, 2010).

O LDL, que contém principalmente ésteres de colesterol e fosfolipídios, circula no sangue e se liga a receptores específicos que estão distribuídos em diversos tecidos, com o objetivo de fornecer o colesterol que poderá ser utilizado para síntese de novos hormônios esteroides, para síntese de membranas celulares e para o metabolismo hepático (BAUER. 1995; RIFAI et al., 1999). O HDL, sintetizado principalmente pelo fígado, desempenha papel importante como doador e receptor de apolipoproteínas (Apo E, Apo C) e vários lipídeos a partir de outras lipoproteínas em circulação (BAUER. 2004). Além disso, são responsáveis por varrerem o excesso de colesterol não esterificado das células e de outras lipoproteínas e os levam de volta para o fígado para ser excretado na bile (chamado de transporte reverso do colesterol) (NELSON; ELLIOT. 2010).

O colesterol HDL é então esterificado pela ação da enzima LCAT e os ésteres de colesterol restantes se movem para o núcleo da molécula, permitindo assim adesão de novas moléculas de colesterol livre que podem ser absorvidas na sua superfície. A absorção contínua de colesterol livre e subsequente esterificação por LCAT, conduz à formação de um maior colesterol rico-éster HDL2 (GINSBERG, 1998; BAUER, 2004).

Em cães, devido à ausência da enzima CETP (*cholesteryl ester transfer protein* - que transforma o HDL2 em HDL1) presente em humanos, as moléculas de HDL2 adquirem continuamente ésteres de colesterol, resultando na formação de moléculas HDL1 exclusivas. Em HDL1, ésteres de colesterol são transferidas para o fígado para eliminação ou reutilização a partir dos tecidos, e não em moléculas de LDL ou VLDL (como em seres humanos), que

transferem o colesterol para os tecidos periféricos. Por esse motivo tem-se sugerido que é esta função de HDL1 que representa a menor incidência de distúrbios ateroscleróticos em cães comparados com humanos (JOHNSON, 2005).

2.3 AVALIAÇÃO LIPÍDICA E TEMPOS DE JEJUM RECOMENDADOS

O colesterol total e triglicerídeos são rotineiramente mensurados na clínica veterinária com o objetivo de avaliar a saúde do cão e pesquisar possíveis complicações decorrentes dos distúrbios no metabolismo lipídico (USUI et al. 2015). Altas concentrações de colesterol total e triglicerídeos podem ocorrer como resultado de dietas hipercalóricas ou gordurosas, patologias sistêmicas e obesidade. Porém, as concentrações de ambas as análises podem variar de acordo com determinadas características no cão.

Os níveis de triglicerídeos em jejum e não jejum e sua predisposição à riscos cardiovasculares, foram avaliados em humanos. O autor afirma a importância da inclusão de análises de triglicerídeos no período pós-prandial e ressalta que este método é um potente preditor para riscos cardiológicos em humanos, além de permite a análise individual no metabolismo lipídico (REDKER, 2008). O teste de tolerância ao triglicerídeo por via oral é um dos métodos utilizados para este fim, onde é realizada a medição dos triglicerídeos antes e depois (2-4 horas) da administração de uma quantidade, calculada por peso, de alimento composto por gordura e carboidrato (MOHANLAL; HOLMAN, 2004). Entretanto, testes com essa metodologia não foram descritas em cães.

Campos et al. (2005) relata que em humanos, os triglicerídeos podem levar até 12 horas para retornar aos níveis de jejum após uma refeição, e por isso se os triglicerídeos pós-prandiais são biologicamente ativos na aterogênese, a medição dos níveis em jejum pode representar inadequadamente o real risco vascular para o desenvolvimento de doenças. Apesar da conhecida correlação entre os níveis de triglicerídeos em jejum e pós-prandial, BANSAL et al. (2007) sugere que os níveis de triglicerídeos pós-prandiais sejam um indicador mais robusto de risco cardiovascular, talvez devido a maior variabilidade dos níveis pós-prandiais na captura de informações importantes sobre o metabolismo individual.

Piccione et al. (2004), avaliou a influência das características fisiológicas (sexo, idade e peso corporal) e seu efeito na lipemia (lipídios totais, triglicerídeos e fosfolipídeos) em 92 cães de diferentes raças, idade e peso corporal, e observou que os valores de triglicerídeos em fêmeas, se diferem estatisticamente quando comparados aos machos, enquanto os demais

parâmetros não se diferem entre si, sugere assim que existam valores de referências diferentes para machos e fêmeas.

Shanna et al. (2005), estudou a distribuição das lipoproteínas e lipídios plasmáticos em cães durante a gestação, lactação e período perinatal. Dietas contendo uma variedade de ácidos graxos saturados (ômega 3 e 9) foram oferecidas às fêmeas estudadas no tempo do estro, gravidez e lactação. Do mesmo modo, os filhotes também se beneficiaram com o suprimento e foram avaliados. O colesterol plasmático e triglicerídeos foram avaliados nesses cães. Chegou-se à conclusão de que a concentração plasmática de colesterol total foi menor no início da gestação e depois houve um aumento dos níveis, independente da dieta oferecida. Durante a lactação, houve diminuição de todos os lipídios séricos comparados ao estado não gestacional. Já em filhotes, durante os 4 a 10 dias de idade houve aumento de β - lipoproteína de colesterol, o que pode ser explicada pelo fato dos cães jovens possuírem ativação dos receptores para apolipoproteína B e E comparados aos cães adultos que possuem atividade indetectável.

Em outro estudo, Piccione et al. (2008), também avaliou os níveis diários de lipídios séricos (ácidos graxos não esterificados [NEFA], triglicerídeos, fosfolipídios, colesterol total e lipídios totais) em cães saudáveis, com relação aos ciclos de claro e escuro (dia e noite) e a presença de jejum. Enquanto que os níveis séricos de NEFA não se alteraram ao longo do dia, os níveis de lipídios totais, colesterol total, fosfolipídios e triglicerídeos se mantiveram normais em cães mantidos sob ciclos de claro/escuro de 12:12 horas e alimentados com uma única refeição diariamente. Somente o padrão rítmico dos triglicerídeos respondeu a um atraso de 6 h no início da luz, sugerindo um papel circadiano em sua geração.

Além disso, ritmos de lipídios totais, colesterol total, fosfolipídios e triglicérides desapareceram quando os cães eram privados de alimento, indicando que esses ritmos são impulsionados pelo processo digestivo e, níveis padrões de soro NEFA foram significativamente maiores durante o jejum do que após a ingestão de alimentos. O autor sugere que o aumento das concentrações de NEFA durante o jejum pode refletir a mobilização do tecido adiposo mediada pela diminuição da insulina, o que leva aos efeitos inibitórios sobre a lipogênese e estimulantes da lipólise (PICCIONE et al., 2008).

Pasquini et al. (2008), avaliou o perfil lipídico sérico de 251 cães saudáveis e os dividiu em grupos de raças, sexo, idade, estilo de vida e estado alimentar. Chegou à conclusão de que o sexo, a idade, raça e a dieta podem afetar significativamente o metabolismo lipídico, em particular as lipoproteínas envolvidas no transporte de colesterol no plasma, o que não ocorre com os triglicerídeos, que não são influenciados por esses fatores.

Langsted et al. (2008), avaliou a influência do jejum nas análises séricas lipídicas em humanos e testou a hipótese de que esses níveis mudariam minimamente em resposta a ingestão de alimentos, além de prever eventos cardiovasculares. Logo, foi possível determinar, que o estado alimentar em humanos, na avaliação de colesterol, triglicerídeos e outros parâmetros do metabolismo lipídico, não sofrem alterações significativas nos níveis séricos no estado pós alimentares, o que pode ser utilizado para análises independentemente do tempo de jejum. E, como o estado de não jejum prediz eventos cardiovasculares, os dados contradizem a necessidade de pedir aos pacientes humanos o jejum alimentar antes de realizar exames que avaliam o perfil lipídico, principalmente para predição de riscos cardiovasculares.

Elliot et al. (2011), avaliou, através de um teste desafio de refeição, o pico da concentração de triglicerídeos pós-prandial em cães. Utilizou 12 cães, sem raça definidas, e saudáveis onde foram alimentados com o mesmo tipo e mesma quantidade de ração, e após um período de 24h coletou-se sangue para avaliação de triglicerídeos após 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 9h e 12h de jejum. Chegou à conclusão que, os valores de triglicerídeos no período pós-prandial e o maior valor durante a curva metabólica, não estão associados.

As concentrações mais altas entre as amostras obtidas foram: 2h, 5h e 6h após o consumo da refeição. Em 5 dos 12 cães, as concentrações de 12 horas após a ingestão alimentar ainda estavam significativamente acima da concentração basal (média das concentrações de jejum de cada cão). Com isso, a concentração de triglicerídeos em jejum não pode ser utilizada para prever com precisão a sua concentração máxima. Ao estimar a concentração máxima de triglicerídeos, amostras múltiplas devem ser coletadas 2, 5 e 6 horas após o consumo de uma refeição padronizada e, alimentos devem ser retidos por mais de 12 horas para avaliação de hipertrigliceridemia em cães.

Kawassumi et al. (2014), investigou as alterações lipêmicas (incluindo colesterol e triglicerídeos) em 24 cães e a associação entre dislipidemias e a condição metabólica em cães com diferentes idades. O distúrbio metabólico lipídico parece ter complicações quando associados à estados nutricionais diferentes, nível inflamação e estresse oxidativo em cães (condições estabelecidas na síndrome metabólica e obesidade). Os dados deste estudo sugerem que esses fatores são afetados pelo envelhecimento assim como ocorre nos humanos.

Estudos relatam que os valores de triglicerídeos e colesterol diferem-se de acordo com raças específicas, idades (filhote, adulto e idoso) e sexo (fêmea e macho). USUI et al. (2014) avaliou 500 cães e 51 raças diferentes, que não possuíam sinais compatíveis com doenças (saudáveis) e sem hiperlipidemia, e comprovou que valores altos de triglicerídeos estão

associados à cães mais idosos, mas não a raças específicas, sexo ou estado reprodutivo. O aumento de colesterol total foi associado ao aumento da idade no cão, mas não ao sexo e estado reprodutivo. Por conta dessas observações, o autor recomenda que veterinários considerem valores de referência para colesterol total e triglicerídeos de acordo com a idade e raças específicas para o diagnóstico de dislipidemias.

Usui et al. (2015), realizou uma pesquisa em clínicas no Japão sobre a recomendação do tempo de jejum para a realização de exames, incluindo o perfil lipídico de cães. Foram avaliados 1538 cães de 75 raças em 374 clínicas entre 2012 e 2013. Mais de 50% das clínicas disseram que recomendavam jejum por 12 horas ou mais. Cães em clínicas com tempo de jejum recomendado maior do que 12h tiveram concentrações mais baixas de triglicerídeos do que aqueles em clínicas com o tempo menor que 8h. Em todos os escores corporais de cães, à medida que a idade do cão aumentou de 0 a 8 anos, as concentrações de colesterol HDL diminuíram 13,5 mg/dl, enquanto que as concentrações de triglicerídeos VLDL aumentaram em 81,7 mg / dl. Em conclusão, o estudo afirma que o tempo de jejum menor ou igual a 8h pode afetar as concentrações lipídicas, e cães obesos (com excesso de peso e escore corporal 7/9) possuem concentrações elevadas de colesterol VLDL e HDL e triglicerídeos.

2.4 HIPERLIPIDEMIA

O termo hiperlipidemia ou dislipidemia refere-se a um aumento na concentração de lipídeos séricos ou plasmáticos (triglicerídeos, colesterol ou ambos) (JOHNSON, 2005). Aumentos séricos de triglicerídeos são referidos como hipertrigliceridemia, assim como aumentos séricos no nível de colesterol são referidos como hipercolesterolemia. Já o termo lipemia ou hiperlipemia refere-se à turvação visível ou aparência lactescente do soro ou plasma durante exames de rotina laboratoriais, e é resultado da hipertrigliceridemia moderada a grave, e é causada pelo aumento dos triglicerídeos nos quilomícrons e/ou VLDL. A hipercolesterolemia sem hipertrigliceridemia não irá provocar a aparição de uma amostra lipêmica (JOHNSON, 2005; THRALL et al., 2012).

Caso seja provocada apenas por quilomícrons, essas substâncias costumam flutuar na parte superior da amostra do soro refrigerado até 10 horas após a coleta, resultando numa camada de material semelhante a creme na parte superior e soro claro na parte inferior, porém, se a lipemia for causada exclusivamente por VLDL, não há formação da camada cremosa e o soro permanece turvo. Logo, está presente no plasma ou no soro quando o mesmo apresenta

severa hipertrigliceridemia (valores > 2,26mmol/L a 3.29mmol/L) (XENOULIS et al. 2015) (Figura 4).

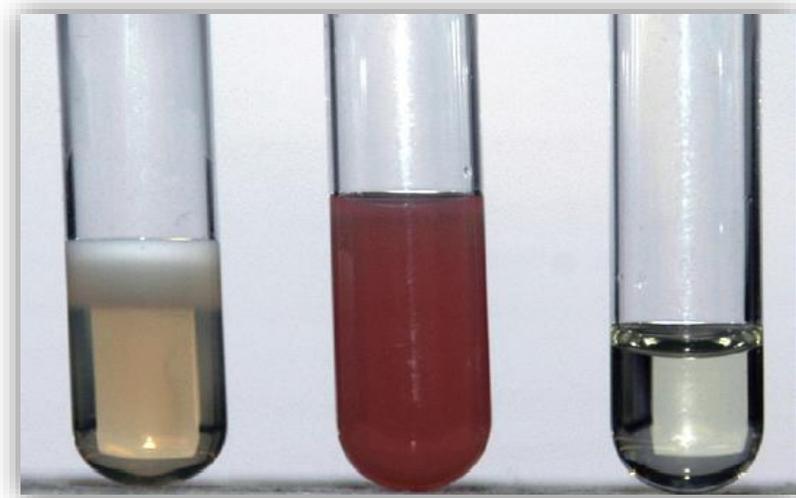


Figura 4. Formação de camada semelhante a creme no topo de uma amostra, indica a presença dos quilomícrons (esquerda). A falha na separação da amostra, indica a presença de VLDL (meio). As amostras normais são claras (direita). Fonte: THRALL et al., 2012.

A hipertrigliceridemia pode ser desenvolvida em consequência do aumento da produção de quilomícrons (ingesta excessiva de lipídeos na dieta), da retirada ineficaz da partícula de quilomícron, do aumento na produção de VLDL (ingestão excessiva de lipídeos na dieta, produção excessiva ou mobilização de lipídeos) e da liberação ineficaz de partículas de VLDL. Já a hipercolesterolemia pode surgir da produção aumentada de partículas precursoras de LDL (VLDL) ou como resultado da liberação reduzida de partículas de LDL ou de HDL (NELSON; ELLIOT, 2010).

As hiperlipidemias podem ser classificadas como: pós-prandiais, quando ocorrem após a ingestão de uma refeição contendo triglicerídeos, hiperlipidemias primárias, causadas por defeitos congênitos no metabolismo de lipoproteínas, sendo incomum em cães e gatos, e hiperlipidemia secundária quando são adquiridos e envolvem células danificadas ou atividade hormonal anormal, sendo relativamente comuns em mamíferos domésticos (JOHNSON, 2005; NELSON; ELLIOT, 2010; THRALL et al., 2012).

2.4.1 Hiperlipidemia pós-prandial

Caracterizada como uma manifestação fisiológica e transitória que se resolve tipicamente entre 7-12 horas após alimentação dependendo da gordura alimentar ingerida (DOWNS et al. 1997; BAUER, 2004; JOHNSON, 2005; NELSON; ELLIOT, 2010). Enquanto outros autores sugerem que a hiperquilomicronemia atinge o pico em 2-6 horas após uma refeição e são depurados em 8-16 horas, uma depuração demorada de quilomícrons indica um metabolismo lipoproteico defeituoso, seja de origem primária ou secundária (SCOTT; STOCKHAM, 2012). Elliot et al. (2011), tipicamente implementam um jejum alimentar de 15 horas antes de avaliar cães para hiperlipidemia.

Para cães e gatos, o jejum de 12 horas permite, segundo Trall et al. (2012), tempo suficiente para a depuração da hiperlipidemia pós-prandial. Já em ruminantes, devido à contínua digestão rumenal e à composição da dieta, eles não apresentam efeitos pós-prandiais significativos e, portanto, não precisam ser jejuados antes da coleta da amostra sanguínea. A persistência de hiperlipidemia após um jejum de 12 horas em cães e gatos sugere uma patogênese alternativa para a hiperlipidemia.

Em animais monogástricos, o consumo de uma dieta rica em gorduras pode contribuir para níveis mais elevados de lipídeos sanguíneos no jejum e momentos pós-prandiais em comparação com dietas normais ou com pouca gordura (TRALL et al., 2012). Não é surpreendente que a hiperlipidemia patológica seja comumente causada por causas secundárias tais como distúrbios hormonais ou metabólicos.

2.4.2 Hiperlipidemia primária

É a causa mais incomum e parece estar relacionada com algumas raças específicas de cães entre elas: Schnauzer Miniatura, Collies, Shetland Sheepdog, Doberman Pinscher, Rottweiler e Beagles (SATO et al., 2000; JEUSETTE et al., 2004; XENOULIS et al., 2007). Já em gatos, está relacionada a uma mutação em genes que codificam a lipoproteína lipase, deixando-a inativa. Autores sugerem que a falta dessa proteína, impede a sua ligação ao endotélio vascular e, portanto, os gatos podem apresentar aumento séricos de quilomícrons, triglicerídeos e colesterol levando a sinais clínicos de baixa massa corporal, desenvolvimento de xantomas e acúmulo de lipídeos oculares (GINZINGER et al., 1999).

Cães da raça Schnauzer miniatura foram as primeiras raças a serem relatadas como acometidas por dislipidemia primária descrita (ROGERS et al., 1975; BAUER, 2004). É caracterizada pelo acúmulo anormal de VLDL ou uma combinação de VLDL e quilomícrons,

sendo a hipercolesterolemia um achado pouco frequente (FORD, 1993). O mecanismo exato e a genética ainda não foram totalmente elucidados. Estudos mais recentes foram realizados (XENOULIS et al., 2007) e mostraram a grande incidência (32,8%) de dislipidemia primária em cães Schanauzers miniaturas saudáveis (192 cães) nos Estados Unidos sendo a gravidade proporcional ao aumento de idade do cão (cães com 6 anos ou mais tiveram incidência de 80% comparados aos cães mais novos). Os mesmos autores sugerem também que, todos os cães da raça Schnauzer miniatura sejam avaliados enquanto saudáveis para evitar a interpretação do aumento de triglicéridos séricos quando os cães se apresentarem doentes, além dos veterinários terem a possibilidade de oferecer dietas de baixa gordura a fim de evitar possíveis complicações consequentes da hipertrigliceridemia.

Em uma família de cães da raça Collie foi descrito hipercolesterolemia sem hipertrigliceridemia no Reino Unido (JAUSETTE et al., 2004). Além disso, outras raças como Shetland Sheepdog, Rotweillers e Doberman Pinschers foram descritos e a ocorrência foi atribuída à hereditariedade. (SATO et al., 2000). Hiperlipidemia primária associada a hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia foi descrito também em cães da raça Beagle (WADA et al., 1977).

2.4.3 Hiperlipidemia secundária

É a forma mais comum e sua ocorrência tem sido associada à inúmeras enfermidades, principalmente as de origem endócrina (diabetes mellitus, obesidade hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo) (NELSON; ELLIOT, 2010), e de outras causas como pancreatite, obesidade, nefropatias com perda proteica, colestase e secundárias a doenças neoplásicas (linfoma) e infecciosas (leishmaniose e parvovirose), causada por administração de drogas (glicocorticoides, estrogênio, fenobarbital e brometo de potássio) (XENOULIS et al., 2015).

Muitas vezes, a hiperlipidemia ocorre sob efeitos sobrepostos à mais de uma doença como ocorre, por exemplo, na pancreatite sendo causa da diabetes mellitus ou ainda do diabetes mellitus em cães em conjunto com o hiperadrenocorticismo sendo relacionada à resistência insulínica que é provocada pela secreção exagerada de corticosteroides endógenos. Muitas destas condições, também possuem um componente inflamatório que resultam num aumento da liberação local sistêmica de citocinas pró-inflamatórias que são capazes de modular todo o metabolismo lipídico.

O hipotireoidismo é uma endocrinopatia pouco frequente e leva ao aumento de lipídios na circulação. Dixon et al. (1999) relata que, a ocorrência de aumentos séricos de colesterol e

triglicerídeos, ocorrem em 88% e 78% dos cães respectivamente. Isso se deve à redução tanto na taxa de degradação quanto na síntese de lipídios, e ao acúmulo de lipídios na circulação. As principais mudanças são o acúmulo de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Há diminuição da excreção biliar de colesterol e por consequência da atividade da lipoproteína lipase, o que retarda a depuração de triglicerídeos tanto de VLDL quanto de quilomícrons, enquanto que a diminuição da atividade de lipase hepática, retarda a depuração de restos de quilomícrons em colesterol (TRHALL et al., 2012)

Já em cães com Diabetes Mellitus, caracterizado por deficiência relativa ou absoluta de insulina, a hiperlipidemia é mais comumente associada à hipertrigliceridemia, porém a hipercolesterolemia pode estar presente (JOHNSON, 2005; NELSON; ELLIOT, 2010). A insulina é necessária para a síntese e atividade da lipoproteína lipase, por isso devido à sua deficiência, haverá incapacidade de eliminação de triglicerídeos, quilomícrons e VLDL. Além disso, os ácidos graxos de cadeia longa se depositam na circulação devido a uma combinação do aumento de lipólise e diminuição na lipogênese pelos adipócitos.

A falta de insulina também aumenta a atividade da enzima lipase hormônio sensível e por consequência leva a hidrólise de triglicerídeos armazenados e liberação de ácidos graxos de cadeia longa na circulação. A insulina também estimula a produção de receptores de LDL, de modo que a hipercolesterolemia ocorre como resultado da diminuição na captação mediadas por esse receptor (THRALL et al., 2012). Cães com hiperadrenocorticismos apresentam hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia devido à estimulação da lipólise induzida por glicocorticoides, porém a hiperlipidemia não é um achado específico, pois os valores de colesterol e triglicerídeos também se elevam em casos de hipotireoidismo e diabetes mellitus (MOONEY; PETERSON, 2015).

O perfil lipídico de cães obesos pode exibir aspecto normal ou aumentos significativos nos valores de triglicerídeos e colesterol. Essa variação ocorre de acordo com a localização do armazenamento de excesso de gordura, duração da obesidade e disfunção de hormônios metabólicos regulatórios como: cortisol, insulina, leptina e adiponectina (JEUSETTE et al., 2005; THRALL et al., 2012).

A obesidade é conhecida como um estado pró-inflamatório liberador de citocinas inflamatórias (interleucina e fator de necrose tumoral). Estes mediadores, podem ter um impacto significativo no metabolismo dos adipócitos e dos lipídios hepáticos além de promover a resistência insulínica e predispor à síndrome metabólica em animais domésticos. Cães obesos mostram um padrão de aumento nos valores de VLDL e HDL (JEUSETTE et al., 2005;

SUAREZ et al., 2008). Porém, as frações de LDL parecem não sofrer interferências o que, pode explicar a resistência relativa dessa espécie para o desenvolvimento de aterosclerose mesmo com hiperlipidemia relacionada à obesidade (THRALL et al., 2012).

A presença de hiperlipidemia tem sido associado à ocorrência de pancreatite em cães (BAUER, 2004; JOHNSON, 2005). Porém, ainda não está claro se a hiperlipidemia se desenvolve como resultado da pancreatite ou como causa da pancreatite (WILLIAMS; STEINER, 2005). Estudos mostram que quando há ocorrência natural da pancreatite com exclusão de outras doenças concomitantes (hipotireoidismo e diabetes mellitus) e há o uso de medicações que podem causar hiperlipidemia, a ocorrência de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia diminuem em 18 e 24%, respectivamente, e a pancreatite ocorre de forma leve (XENOULIS; STEINER, 2010).

Além disso, a presença de hipertrigliceridemia associada à pancreatite pode explicar a impressão clínica de que, o consumo de refeições ricas em gordura, precede ao início da pancreatite aguda. A teoria é que ocorra a intensa hidrólise de quilomícrons por lipases dentro da circulação pancreática, o que resulta em liberação local de ácidos graxos de cadeia longa que possuem alto potencial de danificar células endoteliais e acinares pancreáticas. Dessa maneira o consumo exagerado de gorduras alimentares, levará à liberação contínua de ácidos graxos que são prejudiciais e causam danos no parênquima pancreático levando a pancreatite (THRALL et al., 2012).

A síndrome nefrótica pode se desenvolver como resultado de danos glomerulares e proteinúria decorrentes de uma variedade de etiologias. A proteinúria associada a nefropatia perdedora de proteínas (NPP) é associada com a hiperlipidemia independente da causa. A causa mais comum relatada em cães com NPP é a hipercolesterolemia (LITTMAN, 2000) sendo parte de uma síndrome mais complexa, é caracterizada por hipoalbuminemia, proteinúria e ascite (JOHNSON, 2005), tem sido relatada em cães com doença glomerular adquirida e proteinúria, bem como em várias formas hereditárias de NPP (por exemplo, em raças Sharpeis e Golden Retrievers) (DIBARTOLA et al., 1990; LITTMAN, 2000). Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a hiperlipidemia secundária à proteinúria e hipoalbuminemia. Estudos experimentais em modelos humanos e animais sugerem que podem estar associadas ao aumento de colesterol sintetizado e da atividade enzimática hepática resultando, portanto, em hipercolesterolemia e aumento de lipoproteínas transportadoras de colesterol (TSIMIHODIMOS et al., 2008).

Outras causas incluem dietas ricas em gordura, linfoma, infecção por *Leishmania infantum*, insuficiência cardíaca congestiva devido à cardiomiopatia dilatada, e administração de certos medicamentos (por exemplo, glicocorticoides) (Nieto et al., 1992; TIDHOLM; JONSSON, 1997). Concentrações elevadas de triglicerídeos foram relatadas em associação com outras anormalidades lipídicas em cães com parvovirose (YILMAZ; SENTURK, 2007).

2.5 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS DISLIPIDEMIAS

As dislipidemias têm sido correlacionadas aos novos hábitos alimentares dos cães, que muitas vezes acompanham os hábitos de seus tutores, além do aumento de sobrevida, o que permite o desenvolvimento de distúrbios metabólicos com maior facilidade e rapidez. Os cães afetados estão sob o risco de desenvolver complicações clínicas como pancreatite, distúrbios hepatobiliares, distúrbios oculares e resistência insulínica, o que justifica a intervenção terapêutica mesmo quando a dislipidemia se apresenta de forma branda, a fim de evitar tais complicações.

Embora a hiperlipidemia em si pareça não conduzir diretamente para o desenvolvimento de grandes sinais clínicos, tem sido relatado e associada a outras doenças que são clinicamente importantes e potencialmente fatais. Por isso, sua importância clínica está inclusa nas complicações associadas ao quadro de dislipidemia de forma crônica.

Aumentos de colesterol do tipo VLDL e LDL são fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose em humanos (GOMES; DO CARMO, 2006), e foi associado em conjunto ao desenvolvimento de hipotireoidismo em cães (LIU et al., 1986). Embora os cães pareçam ser resistentes à formação de aterosclerose devido a sua composição de lipoproteínas e metabolismo lipídico (PASQUINI et al., 2008), há certa ocorrência de relatos tanto experimentais quanto clínicos, no desenvolvimento da aterosclerose em cães dislipidêmicos.

Neste estudo, 60% dos 30 cães com aterosclerose tinham hipotireoidismo e 20% tinham diabetes mellitus (HESS et al., 2003). A resistência insulínica pode ocorrer, como complicações importantes, em cães com distúrbios no metabolismo lipídico. Em um estudo recente, quase 30% dos cães da raça Shinauzer miniatura com hipertrigliceridemia primária apresentam evidências de resistência insulínica através da análise da concentração sérica de insulina (XENOULIS et al., 2011).

A dislipidemia é avaliada por alguns autores, como fator de risco para a pancreatite canina (COOK et al., 1993; XENOULIS; STEINER, 2010). Além disso, a elevada prevalência de pancreatite nas raças Schnauzers miniatura foi atribuída ao fato de que os cães desenvolvem com certa frequência a dislipidemia primária (WILLIAMS, 1996). Dois estudos clínicos recentes, forneceram evidências mais fortes de que hipertrigliceridemia, especialmente grave (maior ou igual a 10 mmol/L), é um fator de risco para pancreatite em Schnauzer Miniatura (XENOULIS; STEINER, 2010). O mecanismo pelo qual a hipertrigliceridemia induz a pancreatite não é claro mas tem-se sugerido que os triglicerídeos séricos são hidrolisados pela ação de lipases pancreáticas, conduzindo a uma produção excessiva de ácidos graxos livres que são tóxicos para o pâncreas (SAHARIA et al., 1977).

Estudos clínicos sugerem que a hepatopatia vacuolar e mucocele biliar podem estar associados à hipertrigliceridemia (SCHERK; CENTER, 2005). Foi descrito, uma associação entre formação de mucocele de vesícula biliar e dislipidemia descrita em cães da raça Shetland Sheepdogs (AGUIRRE et al., 2007). Várias manifestações oculares têm sido relatadas em cães dislipidêmicos como lipemia retiniana, lipemia aquosa e ceratopatia lipídica têm sido relatados em cães (CRISPIN, 1993).

Outras possíveis complicações da dislipidemia incluem convulsões e outros sinais neurológicos (VITALE; OLBY, 2007). Contudo, a relação entre esses transtornos permanece desconhecidos em cães. Além disso, alguns autores relatam que a hiperlipidemia pode causar sinais clínicos de dor abdominal, letargia, vômitos e/ou diarreia sem evidência de pancreatite ou outras doenças (FORD, 1996).

2.6 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA DAS DISLIPIDEMIAS

Observações feitas no laboratório LQEPV mostraram que cães podem ser erroneamente classificados como dislipidêmicos de acordo com o jejum alimentar submetido. Em um estudo piloto com a finalidade de identificar portadores de endocrinopatia (hipotireoidismo), foi verificado que um cão, quando submetido ao jejum alimentar inferior a 8 horas, possui valores de colesterol e/ou triglicerídeos acima do valor de referência para a espécie, sendo classificado como dislipidêmico. Porém, quando o mesmo cão foi submetido ao jejum alimentar de 12 horas, os níveis séricos haviam se normalizados. Não há na literatura veterinária valores específicos para o jejum alimentar no cão, sendo essas recomendações realizadas a partir de estudos em humanos. Há pesquisas que mostram diferenças nos valores de colesterol e triglicerídeos entre raças diferentes, sexos (machos e fêmeas), idades (filhote, adulto e idoso) e perfil reprodutivo

(castrado e não castrado) mas, não há estudos que avaliem os diferentes tempos de jejum alimentar para tal avaliação (XENOULIS et al., 2007; USUI et al., 2014; KAWASUMI et al., 2014).

A hiperlipidemia é tipicamente avaliada através de dosagens séricas de triglicerídeos e/ou colesterol em jejum alimentar de pelo menos 12 horas (JOHNSON, 2005), outros autores sugerem jejum alimentar de até 15 horas (XENOULIS et al, 2015), enquanto outros autores relatam avaliação com apenas 10 horas de jejum alimentar (NELSON; ELLIOT, 2010). Como a dislipidemia é comumente consequência de outras doenças, o seu indício pode direcionar no diagnóstico primário, já em dislipidemias primárias o aumento sérico de triglicerídeos e/ou colesterol pode ser a única anormalidade. Com o objetivo de avaliar precocemente a dislipidemia, Xenoulis et al. (2015), sugere a inclusão do perfil lipídico em todos os exames bioquímicos de rotina.

Uma anamnese e exame físico detalhado devem ser obtidos uma vez que cães com dislipidemia secundária apresentam sinais clínicos compatíveis com a doença de base (por exemplo, a obesidade, poliúria, polidipsia em cães com diabetes mellitus ou hiperadrenocorticismismo, letargia, e alopecia em cães com hipotireoidismo), e podem ajudar a priorizar a seleção de testes de diagnóstico e direcionar a um plano terapêutico. Já cães com hiperlipidemia primária podem ou não ter sinais clínicos (XENOULIS et al., 2015).

Testes adicionais podem ser úteis para a investigação diagnóstica de cães com hiperlipidemia e incluem, a medição das concentrações de tiroxina livre, lipase pancreática sérica, concentrações biliares no soro, proteína na urina: creatinina, e teste de supressão por dexametasona em baixa dose para avaliar cortisol na suspeita de hiperadrenocorticismismo. A seleção dos testes a serem realizados é baseada em informações a partir da anamnese, exame físico e achados clínico-patológicas, e é adaptado a cada caso individual (XENOULIS et al., 2015).

Cães de raças predispostas a dislipidemia primária como Schnauzer miniatura, Collies, Shetland Sheepdog, Rotweillers, Doberman e Beagles devem ser avaliados para hiperlipidemia ainda saudáveis, pois essa informação pode ser útil para evitar má interpretação do aumento de triglicérides e colesterol séricos quando estes apresentarem uma doença que curse ou piore com tal alteração (XENOULIS et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

A pesquisa foi realizada em sua totalidade no Município de Seropédica, no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), realizado nos meses entre julho e setembro de 2016. Os animais foram mantidos nas instalações do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) (Figura 5), do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária.

Os exames laboratoriais foram realizados no setor de Patologia Clínica do LQEPV.



Figura 5. Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro– A) Canis Coletivos; B) Canis Individuais.

3.2 AVALIAÇÃO PRÉ-EXPERIMENTAL

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IV-UFRRJ) - sob o número de 74952806/16 (ANEXO I).

Foram utilizados 28 animais da espécie canina, da raça Beagle, 13 machos e 15 fêmeas, clinicamente saudáveis, não obesos, com pesos variando entre 12 e 14kg e escore corporal entre 5-6/9, com idades entre 1-6 anos (adultos), não castrados, oriundos do canil do Laboratório (LQEPV). Os animais que apresentavam parâmetros de hemograma e bioquímica clínica normais (Alanino amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia, creatinina, glicose e proteínas totais) e sem a presença de dislipidemias (colesterol e triglicérides) com jejum de doze horas, conforme referenciado à medicina humana. Os animais com doenças

concomitantes, que estivessem realizando qualquer tratamento por um período inferior a 60 dias foram excluídos do experimento, inclusive os animais já em tratamento para a doença.

Para a escolha dos 28 animais, do presente estudo, no dia -7, foi realizado uma avaliação pré-experimental, composta de avaliação clínica e laboratorial. Na avaliação clínica foram realizados os parâmetros fisiológicos, tais como: temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar, inspeção de linfonodos e avaliação de mucosas, escore corporal, inspeção da pele e pelos e doenças concomitantes, a fim de utilizar apenas cães saudáveis. Para esta finalidade foram colhidas amostras de 10 ml de sangue venoso que foram divididos em tubos com EDTA e tubos sem anticoagulante, para realização de hemograma, perfil hepático (fosfatase alcalina, alanino aminotransferase (ALT), renal (uréia, creatinina), além de lipidograma (colesterol total, triglicerídeos e glicose).

Os dados referentes à hematimetria, leucometria global e plaquetometria foram obtidos utilizando o analisador hematológico veterinário¹ automatizado. A concentração da proteína plasmática total foi mensurada por refratometria. Para o exame bioquímico foi utilizado analisador bioquímico² automatizado. As avaliações das atividades enzimáticas de ALT, fosfatase alcalina, foram realizadas por cinética mono-reagente e a creatinina e a uréia foram dosadas por reação de tempo fixo mono-reagente. O lipidograma (colesterol e triglicerídeos) foi realizado através do método colorimétrico automatizado.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os 28 cães foram separados em canis individuais, identificados externamente com numerações em chip, (Figura 6). No canil, os animais permaneceram com água *ad libitum* e receberam a mesma quantidade de comida a cada 24 horas durante 7 dias. Foi realizado na semana anterior (no dia -7) uma adaptação dos cães nos canis, com o objetivo de realizar a ambientação dos cães e evitar o estresse do confinamento (aclimatação).

¹ Poch-100iVDiff - SYSMEX DO BRASIL

² A15 – BioSystems S.A.



Figura 6. Canil individualizado de alvenaria. (Com aviso de não alimentar)

No dia 0, todos os cães receberam a mesma quantidade de comida, (ração seca: PREMIUM/MUST CÃES na quantidade de 300g por cão), todos juntos no tempo 0h (horário 23:45 da noite). Aguardou-se 15 minutos para o término da ingestão e retirado o recipiente de comida sempre na mesma ordem. Todos os cães comeram todo o conteúdo.

No dia 0 foram realizadas as coletas sanguíneas para dosagem de colesterol e triglicérides nos seguintes tempos: 6; 8; 10; 12; 14 e 16 horas de jejum alimentar (Figura 7). Para isso foi coletado 5ml de sangue da Veia Jugular (Figura 8) com auxílio do Vacutainer em tubos de bioquímicas sem EDTA, as amostras não sofreram hemólise (uma vez que amostras hemolisadas podem aumentar a concentração de colesterol sérico). As amostras foram coletadas sempre pela mesma pessoa e o mesmo auxiliar, com a finalidade de diminuir o estresse da coleta e, após o término das coletas, os cães foram alimentados normalmente e liberados para seus canis coletivos.

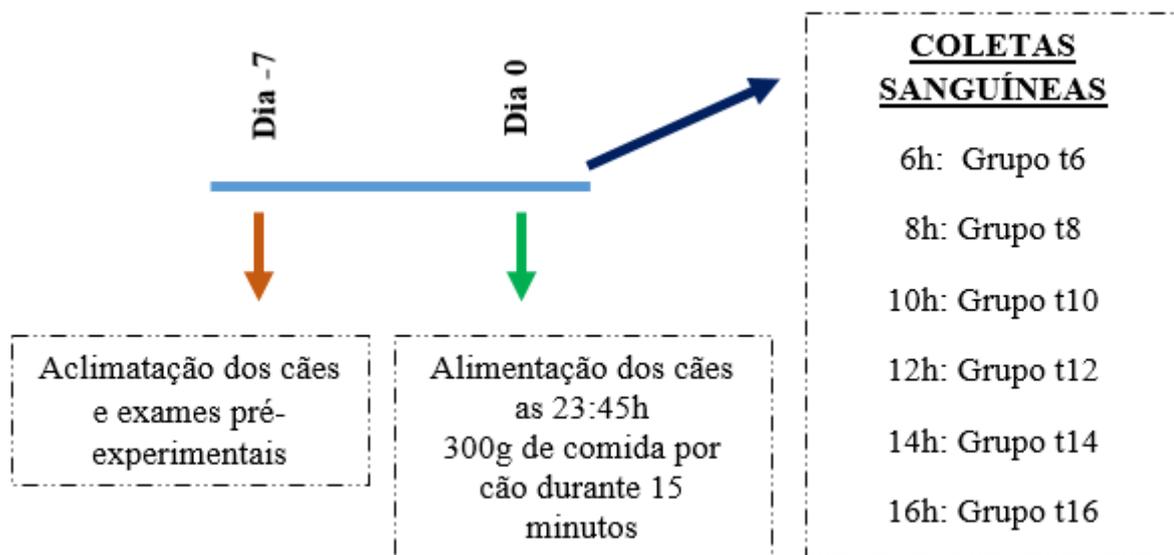


Figura 7. Delineamento experimental para mensuração de triglicerídeos e colesterol em cães da raça Beagle com diferentes intervalos de tempo.

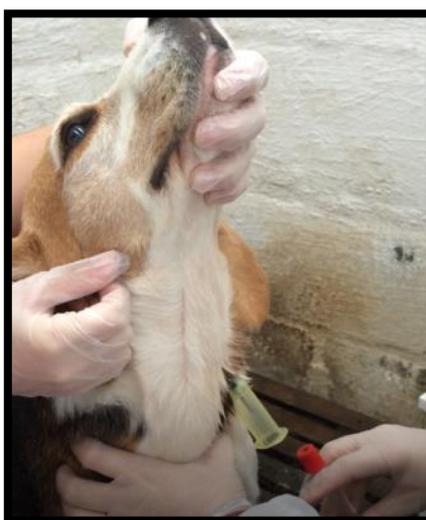


Figura 8. Coleta de sangue com Vacutainer para obtenção de amostra sanguínea.

Os dados com os valores de colesterol e triglicerídeos foram tabulados nos diferentes tempos em que os animais foram submetidos ao jejum para posterior análise estatística.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A seguir são apresentadas as análises estatísticas aplicadas aos dados coletados e as premissas adotadas:

- a) Análise estatística descritiva das amostras coletadas (média, desvio padrão, coeficiente de variação e gráfico box-plot com identificação de outliers);
- b) Teste de normalidade das amostras coletadas através do gráfico de probabilidade normal e teste de Shapiro-Wilk;
- c) Aplicação do teste t-student (paramétrico) ou Mann-Whitney (não-paramétrico), quando apropriado, para verificação se a média entre os grupos macho e fêmea são estatisticamente diferentes;
- d) Aplicação do teste t-student pareado (paramétrico) ou Wilcoxon pareado (não-paramétrico) para verificação quanto a existência de diferença significativa entre pares de tempo de coleta de cada variável (colesterol e triglicérideo);
- e) Nível de confiança de 95% para todos os testes estatísticos utilizados (p-valor = 5%);
- f) Testes com análises unilaterais (uni caudal);

Antes de realizar a aplicação dos testes estatísticos, é necessário saber se a distribuição amostral da variável em teste pode ser considerada como uma distribuição normal. Se assim confirmado, o teste estatístico paramétrico t-student/t-student pareado pode ser aplicado à amostra sem violar uma de suas premissas de utilização. Caso a distribuição normal não possa caracterizar a amostra, o teste estatístico não-paramétrico Mann-Whitney/Wilcoxon pareado será utilizado.

Para as análises estatísticas foram utilizados dois programas principais: Microsoft Excel® 2013 e STATISTICA® v.10 (StatSoft).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados todos os dados coletados, análise de consistência dos mesmos e tratamento estatístico de forma a extrair informações consistentes e com determinado nível de confiança.

Os gráficos apresentados nesta seção apresentam dois tipos de nomenclatura diferentes. Nomenclatura 1 ex.: F1 ou M10, onde “F” ou “M” definem o gênero fêmea ou macho e “1”...”15” indicam o número do animal amostrado. Nomenclatura 2 ex.: F_C_6h ou M_T_14h, onde “F” ou “M” definem o gênero fêmea ou macho, “C” ou “T” definem a variável colesterol ou triglicerídeo e “6h”...”16h” definem o tempo coletado do sangue do animal amostrado.

As variáveis colesterol e triglicerídeo foram analisadas em seções dedicadas deixando para o final desta seção as avaliações comparativas entre as mesmas.

4.1 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL EM DIFERENTES TEMPOS DE JEJUM ALIMENTAR

Os dados amostrais coletados em diferentes tempos de jejum, referente à variável colesterol estão descritos na Tabela 1.

A Tabela 2 apresenta a estatística básica de média, desvio padrão e coeficiente de variação considerando todos os animais (machos e fêmeas) contidos na Tabela 1. É observado que a média dos níveis de colesterol tem uma tendência de queda até atingir os tempos de 10 a 12 horas, e logo após apresenta sinais de estabilização. O desvio padrão não apresenta grandes variações em relação ao seu valor médio de 45,3mg/dl. O coeficiente de variação segue o mesmo comportamento do desvio padrão, mantendo uma média de 27,5%.

Tabela 1. Análise Individual dos valores de colesterol obtidos em cães da raça Beagle submetidos a diferentes tempos de jejum. (Valor de Referência: 135 a 270mg/dL de acordo com KANEKO et al., 2008).

ANIMAL	VALORES DE COLESTEROL (mg/dl)					
	JEJUM	JEJUM	JEJUM	JEJUM	JEJUM	JEJUM
	6h	8h	10h	12h	14h	16h
F1	181	190	180	159	167	160
F2	148	149	115	134	139	134
F3	250	251	227	235	222	225
F4	204	195	188	184	191	188
F5	192	198	180	173	179	181
F6	197	193	185	184	179	185
F7	151	153	140	147	138	142
F8	139	135	130	127	128	129
F9	158	160	152	125	135	134
F10	150	143	125	135	126	129
F11	169	166	155	153	150	150
F12	261	263	244	238	239	245
F13	146	148	122	123	120	122
F14	169	177	166	158	158	151
F15	323	313	305	326	306	313
M1	148	137	126	125	119	126
M2	160	148	145	135	142	140
M3	186	176	174	172	171	165
M4	225	220	208	206	196	204
M5	131	137	127	119	122	123
M6	104	104	94	94	100	98
M7	192	182	179	176	167	182
M8	152	146	130	136	136	134
M9	144	141	122	120	105	117
M10	168	168	157	138	143	149
M11	174	158	133	140	129	138
M12	211	203	178	166	166	176
M13	151	143	125	125	131	129

Tabela 2. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de colesterol para o grupo total de animais (machos e fêmeas)

Grupo total de animais (28) – Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação Colesterol (mg/dl). Referência: 135-270mg/dL (KANEKO et al., 2008)						
Tempo de Coleta (horas)	6	8	10	12	14	16
Média	178.0	174.9	161.1	159.0	157.3	159.6
Desvio Padrão	45.1	44.6	45.2	47.3	44.1	45.3
COV	25.4%	25.5%	28.1%	29.8%	28.1%	28.4%

A Figura 9 e a Figura 10 apresentam os gráficos box-plot para os grupos de fêmeas e machos, respectivamente. O grupo de fêmeas (Figura 9) apresenta um *outlier* em cada tempo de coleta analisado, ou seja, um valor discrepante, representado sempre pelo mesmo animal F15. Durante a triagem inicial dos animais, a amostra F15 não apresentou um quadro de hiperlipidemia. Durante os ensaios, os valores de colesterol medidos deste animal foram 323, 313, 305, 326, 306 e 316 mg/dl para os tempos de jejum de 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas, respectivamente, valores muito acima da faixa de referência de 20 a 112 mg/dl. Os exames pré-experimentais foram realizados uma semana antes do experimento, e neste período o cão pode ter ficado dislipidêmico ou adquirido doenças concomitantes (THRALL et al., 2012) que influenciam a avaliação lipídica. Outro possível motivo pode ter sido pelo fato de o animal F15 ter entrado no estro, onde os hormônios sexuais na fase reprodutiva têm influência direta nas medições de colesterol (XENOULIS et al., 2015). Após avaliação dos resultados apresentados no ensaio, o mesmo será descartado para a realização das análises subsequentes. O grupo de machos não apresentou valores discrepantes, logo todos os animais são considerados aptos às análises.

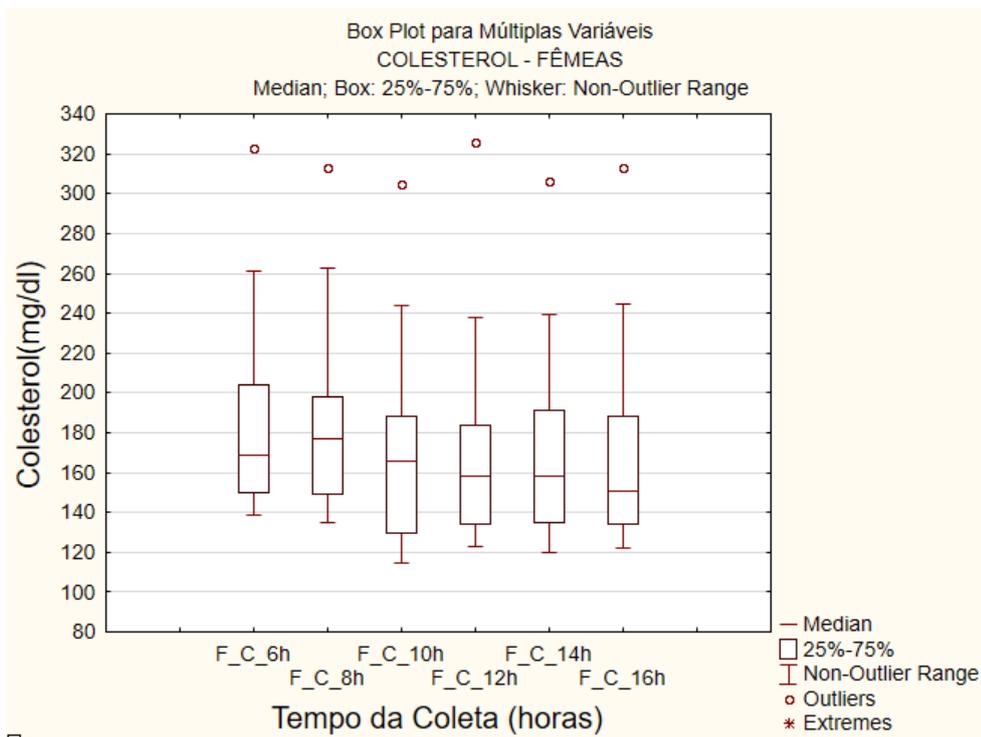


Figura 9. Gráfico box-plot que apresenta a distribuição dos dados do colesterol das fêmeas para cada tempo de jejum realizado.

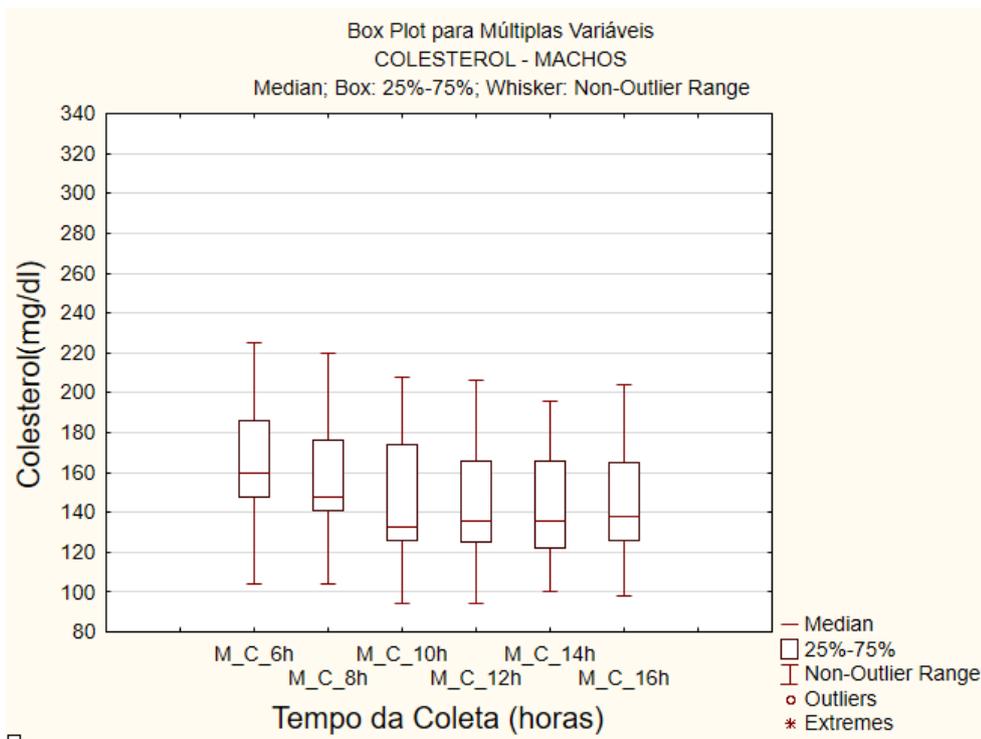


Figura 10. Gráfico box-plot que apresenta a distribuição dos dados do colesterol dos machos para cada tempo de jejum realizado

A Figura 11 apresenta o comportamento da média do colesterol dosado ao longo dos tempos de cada coleta para os grupos de machos, fêmeas e todos os animais (machos e fêmeas juntos). Visualmente, é possível observar uma tendência de estabilização dos valores médios do colesterol a partir de uma coleta com 10 horas de jejum. Uma diferença importante na ordem de grandeza entre as médias dos grupos dos machos e fêmeas sugerem uma análise com maior detalhe, com a aplicação de um teste estatístico para verificar se de fato existe uma diferença significativa entre as médias.

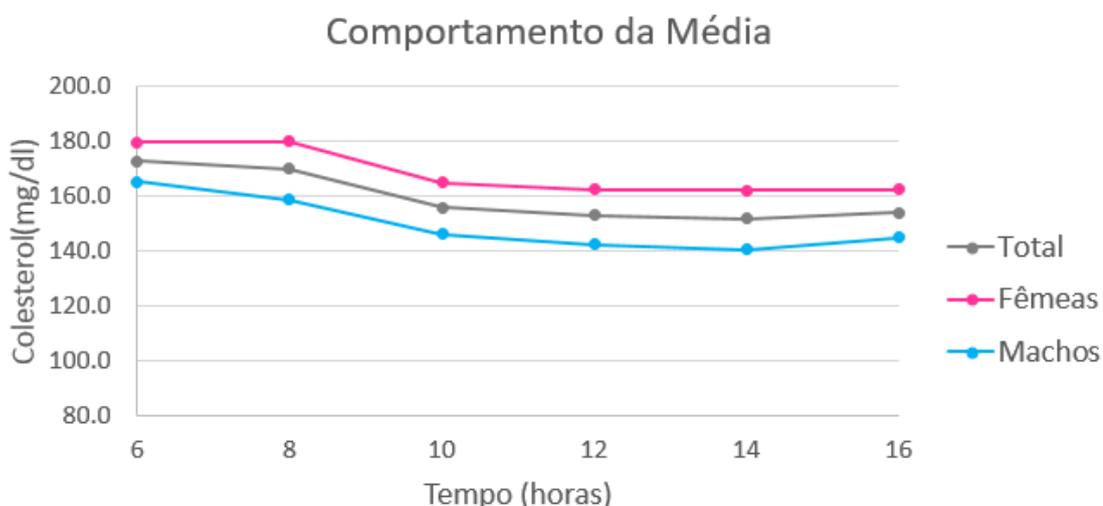


Figura 11. Comportamento da média do colesterol para cada tempo de coleta de todos os animais, apenas fêmeas e apenas machos

A Figura 12 apresenta o comportamento do coeficiente de variação (COV) do colesterol dosado ao longo dos tempos de cada coleta para os grupos de machos, fêmeas e todos os animais (machos e fêmeas juntos). O COV do grupo dos machos apresenta-se com pouca dispersão ao longo dos tempos de coleta, apresentando uma estabilidade em torno do valor de COV de 20,3%. A média observada do COV para as fêmeas ficou em 22,5%, variando pouco em relação a este valor e evidencia um comportamento similar em relação aos machos.

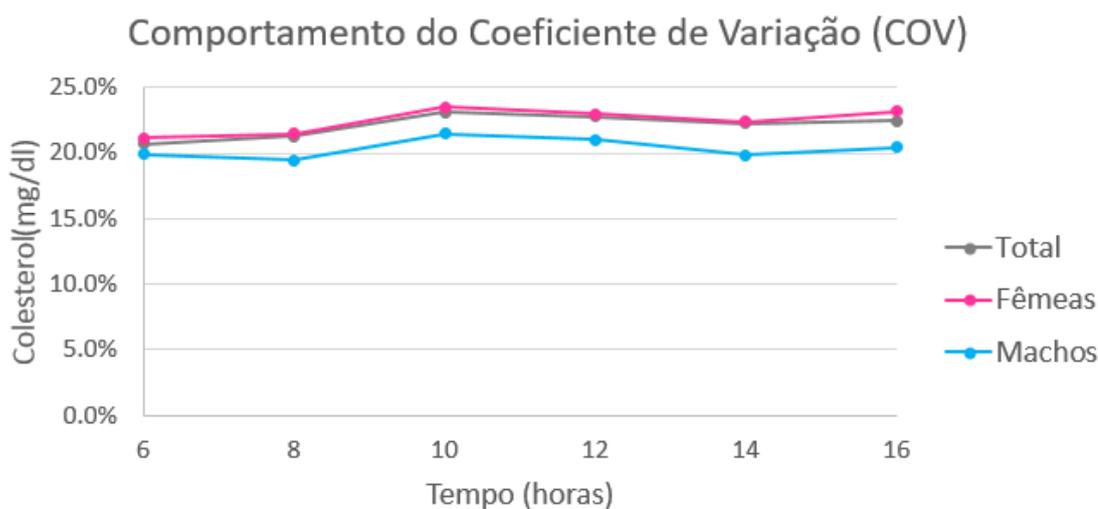


Figura 12. Comportamento do coeficiente de variação do colesterol para cada tempo de coleta de todos os animais, apenas fêmeas e apenas machos.

Os valores utilizados para construir os gráficos da Figura 11 e Figura 12 são apresentados na Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5.

Tabela 3. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de colesterol para o grupo total de animais (machos e fêmeas)

Grupo total de animais (27) – Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação						
Colesterol (mg/dl) Referência: 135-270mg/dL (KANEKO et al., 2008)						
Tempo de Coleta (horas)	6	8	10	12	14	16
Média	172.6	169.8	155.8	152.9	151.8	153.9
Desvio Padrão	35.7	36.1	36.0	34.9	33.8	34.6
COV	20.7%	21.3%	23.1%	22.8%	22.3%	22.5%

Tabela 4. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de colesterol para o grupo de fêmeas

Grupo de Fêmeas (14) – Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação						
Colesterol (mg/dl) Referência: 135-270mg/dL (KANEKO et al., 2008)						
Tempo de Coleta (horas)	6	8	10	12	14	16
Média	179.6	180.1	164.9	162.5	162.2	162.5
Desvio Padrão	38.0	38.7	38.8	37.4	36.4	37.7
CoV	21.2%	21.5%	23.5%	23.0%	22.4%	23.2%

Tabela 5. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de colesterol para o grupo de machos

Grupo de Machos (13) – Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação						
Colesterol (mg/dl) Referência: 135-270mg/dL (KANEKO et al., 2008)						
Tempo de Coleta (horas)	6	8	10	12	14	16
Média	165.1	158.7	146.0	142.5	140.5	144.7
Desvio Padrão	32.9	30.8	31.3	29.9	27.9	29.6
CoV	19.9%	19.4%	21.5%	21.0%	19.8%	20.5%

A Figura 13 e Figura 14 apresentam os gráficos de probabilidade normal para os grupos de fêmea e macho, respectivamente, apresentando ao mesmo tempo uma tabela com os resultados do teste de normalidade Shapiro-Wilk e seus p-valores associados, para cada tempo de coleta.

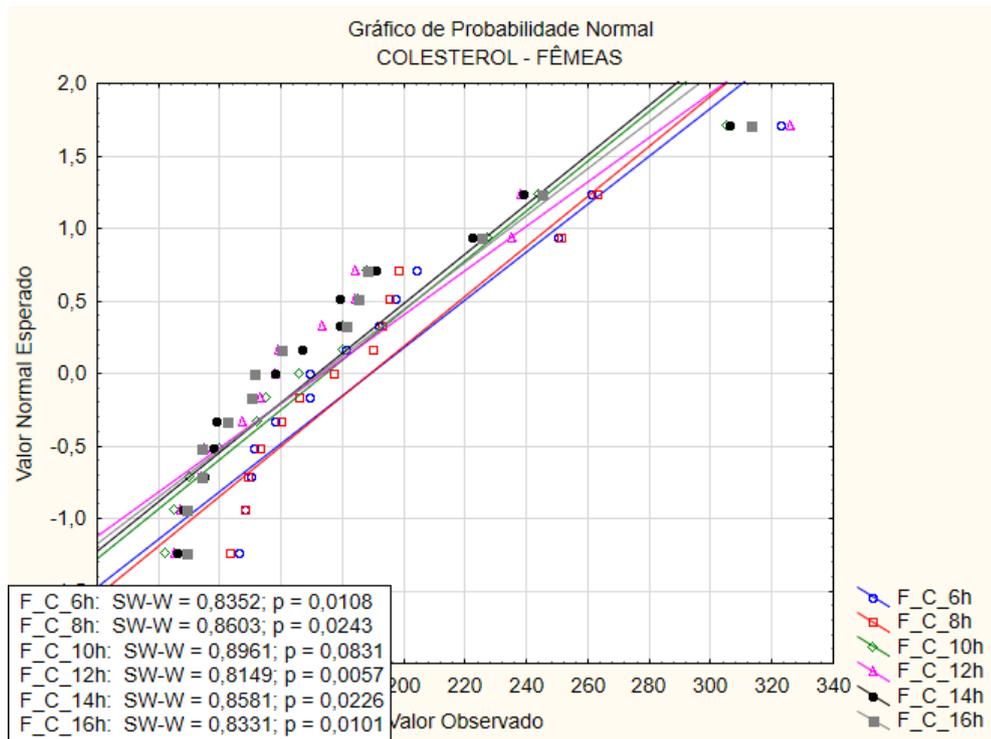


Figura 13. Gráfico de probabilidade normal aplicado ao grupo de fêmeas

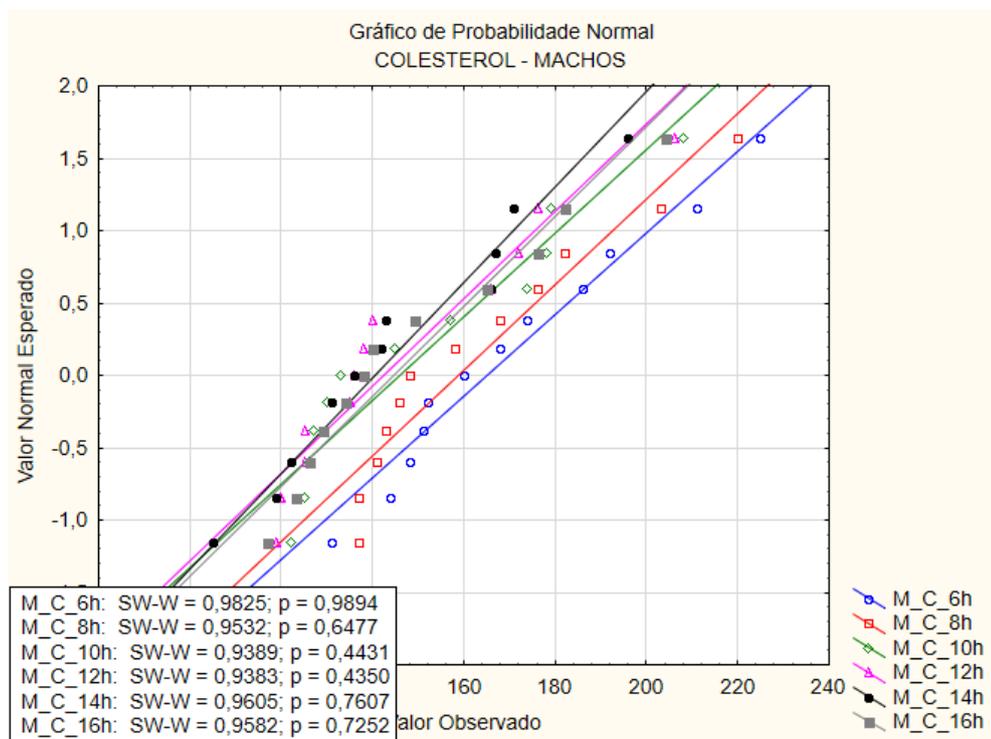


Figura 14. Gráfico de probabilidade normal aplicado ao grupo de machos

O grupo das fêmeas (Figura 13) apresenta p-valores menores que 5% (0,05), exceto para o tempo de coleta de 10 horas. Os resultados indicam que a distribuição normal pode ser considerada para caracterizar a distribuição do colesterol deste grupo. O grupo dos machos (Figura 14) apresentam p-valores maiores que 5% (0,05), indicando que a distribuição normal não pode ser considerada para caracterizar a distribuição do colesterol deste grupo. Os testes de normalidade, em geral, são muito rigorosos, e em certas situações seus resultados podem ser penalizados por um tamanho amostral pequeno e devem ser confrontados com análises visuais dos dados. Apesar do tamanho amostral não ser grande, o resultado do teste de normalidade será aceito, e logo, quando este grupo for analisado, apenas testes não-paramétricos serão utilizados, Mann-Whitney/Wilcoxon pareado.

Após primeira análise do comportamento da média dos animais, foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney para avaliar, com 95% de confiança, se existe uma diferença significativa entre as médias dos grupos de machos e fêmeas. O teste foi aplicado a cada tempo de coleta e os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6. Teste Mann-Whitney para avaliar a diferença das médias do colesterol entre os grupos dos machos e fêmeas

z crítico = -1.644 (95% de confiança)	Teste Mann-Whitney -- Colesterol					
	6h	8h	10h	12h	14h	16h
Resultado do Teste (z)	-1.36	-2.14	-1.84	-1.99	-2.14	-1.89
Apresenta diferença estatística entre as médias do colesterol dos machos e fêmeas?	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
P-valor	0.09	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03

Em praticamente todos os tempos de coleta, exceto para o tempo de 6 horas, o teste estatístico indica que existe diferença significativa entre as médias de colesterol entre os grupos dos machos e das fêmeas. Isto indica que estes grupos não podem ser considerados advindos de uma mesma população e devem ser analisados separadamente. As análises posteriores de verificação quanto à diferença entre as horas de coleta do colesterol serão realizadas de forma separada para cada grupo e não como um grupo total de animais que contem machos e fêmeas.

A Tabela 7 e Tabela 8 apresentam os resultados do teste estatístico t-student pareado aplicado ao grupo de fêmeas e o Wilcoxon pareado aplicado ao grupo de machos, respectivamente, para verificar quanto a existência de diferença entre as médias do colesterol medidos em diferentes tempos de coleta para os grupos de fêmeas e machos, respectivamente.

Tabela 7. Teste estatístico t-student para avaliar a diferença das médias entre os tempos de coleta do colesterol no grupo fêmeas

t crítico = -1.761 (95% de confiança)	Teste Estatístico t-student pareado -- Colesterol - FÊMEAS				
Tempo de Coleta	6h-8h	8h-10h	10h-12h	12h-14h	14h-16h
Resultado do Teste (t)	-0.18	-6.83	-0.26	-0.73	0.63
Apresenta diferença estatística entre as médias dos tempos de coleta do colesterol das fêmeas?	Não	Sim	Não	Não	Não
P-valor	0.62	<0,001	0.23	0.44	0.60

Tabela 8. Teste estatístico Wilcoxon pareado para avaliar a diferença das médias entre os tempos de coleta do colesterol no grupo machos

W crítico variável (95% de confiança)	Teste Estatístico Wilcoxon (pareado) -- Colesterol - MACHOS				
Tempo de Coleta	6hr-8hr	8hr-10hr	10hr-12hr	12hr-14hr	14hr-16hr
W crítico =	13.0	21.0	13.0	13.0	21.0
Resultado do Teste (w)	3.5	0.0	13.0	22.0	20.5
Apresenta diferença estatística entre as médias dos tempos de coleta do colesterol dos machos?	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
P-valor	<0.05	<0.05	<0.05	>0.10	<0.05

Segundo a Tabela 7, o grupo de fêmeas apresentou uma queda significativa no valor do colesterol apenas entre os tempos de coleta de 8 e 10 horas. Todas as outras comparações entre os tempos não resultaram em uma diferença significativa, indicando grande semelhança entre os resultados. A partir do tempo de 10 horas de jejum, não é percebido nenhuma variação importante nos valores médios de colesterol, sendo este o tempo mínimo de jejum necessário para o grupo de fêmeas.

Já a Tabela 8, que analisa os valores de colesterol dos machos, mostra uma queda significativa no valor do colesterol entre os tempos de coleta de 6 e 8 horas, 8 e 10 horas e 10 e 12 horas consecutivamente. O teste reporta que não existe diferença significativa de colesterol entre 12 e 14 horas, indicando que o menor tempo de coleta é de 12 horas de jejum.

Na avaliação da diferença entre os tempos de 14 e 16 horas, o resultado do teste conclui que existe uma diferença significativa, indicando que a partir destes tempos de jejum, existe a tendência de aumento do colesterol. A possível explicação para este fato está relacionada ao fato do grupo dos machos poder esgotar suas reservas energéticas de forma mais rápida que o grupo das fêmeas, sugerindo que após este tempo, ele utilize reservas de gordura para obter energia. Fato diferente ocorre em seres humanos, onde a demanda energética através de utilização de tecido adiposo ocorre apenas no jejum alimentar de mais de 24 horas (AIRES et al., 2012). Estas análises sugerem que além do tempo mínimo de jejum de 12 horas deve-se também estabelecer um tempo máximo.

Ainda segundo AIRES et al. (2012), quando o jejum em humanos se inicia, a tendência de queda dos níveis glicêmicos estimula a glicogenólise hepática, que representa o mecanismo inicial para a correção da glicemia. Como as reservas de glicogênio hepático tendem a se esgotar rapidamente, ocorre aumento da atividade neoglicogênica. Os principais substratos para a neoglicogênese são aminoácidos provenientes da proteólise muscular. Essas alterações são acompanhadas por uma queda dos níveis circulantes de insulina e aumento dos níveis de glucagon, epinefrina, cortisol e hormônio de crescimento. Os hormônios cujos níveis aumentam em resposta à hipoglicemia são conhecidos como hormônios contrarregulatórios da insulina. A queda da relação insulina/glucagon durante o jejum, além de promover as alterações metabólicas aqui descritas, ativa o processo de lipólise no tecido adiposo e mobilização de lipídios para circulação.

Segundo os testes realizados neste trabalho, o menor tempo para avaliação do colesterol em fêmeas é de 10 horas e em machos é de 12 horas.

4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRIGLICERÍDEOS EM DIFERENTES TEMPOS DE JEJUM ALIMENTAR

Os dados amostrais coletados em diferentes tempos de jejum, referente à variável triglicerídeo, são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Análise individual dos valores de triglicerídeos obtidos em cães da raça Beagle submetidos a diferentes tempos de jejum. Ref.: 20 a 112 mg/dL (KANEKO et al., 2008).

ANIMAL	VALORES DE TRIGLICERÍDEO (mg/dl)					
	JEJUM 6h	JEJUM 8h	JEJUM 10h	JEJUM 12h	JEJUM 14h	JEJUM 16h
F1	220	147	79	94	65	38
F2	186	97	50	64	43	54
F3	201	136	104	80	68	74
F4	59	57	39	49	46	46
F5	206	121	70	56	34	36
F6	152	107	82	53	50	53
F7	243	152	149	144	76	57
F8	160	135	72	125	61	60
F9	241	222	143	51	31	54
F10	105	89	42	34	27	24
F11	133	119	118	60	45	81
F12	242	201	89	64	51	49
F13	136	83	69	45	26	46
F14	196	162	141	83	58	50
F15	170	151	126	103	80	60
M1	172	152	90	51	45	52
M2	48	55	40	53	39	31
M3	133	72	65	79	107	53
M4	137	90	111	52	32	29
M5	143	94	97	52	48	42
M6	96	62	14	37	37	36
M7	39	55	41	33	31	22
M8	126	69	47	33	36	35
M9	61	37	37	33	29	36
M10	82	49	62	46	79	50
M11	148	87	64	40	40	44
M12	112	68	39	40	46	34
M13	86	54	32	33	27	25

A Tabela 10 apresenta a estatística básica de média, desvio padrão e coeficiente de variação considerando todos os animais (machos e fêmeas) contidos na Tabela 9. É observado que a média dos níveis de triglicerídeo tem uma rápida queda de seus valores até os tempos de coleta de 12 e 14 horas, e logo após apresenta sinais de estabilização. O desvio padrão também apresenta redução de seu valor ao longo dos tempos de coleta. O coeficiente de variação varia pouco até o tempo de coleta de 12 horas, mantendo uma média de 45,7% e inicia uma queda após este tempo.

Tabela 10. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de triglicerídeos para o grupo total de animais (machos e fêmeas)

Grupo total de animais (28) – Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação Triglicerídeos totais (mg/dl). Referência: 20 a 112 mg/dL (KANEKO et al., 2008)						
Tempo de Coleta (horas)	6	8	10	12	14	16
Média	144.0	104.4	75.4	60.3	48.5	45.4
Desvio Padrão	59.3	47.7	37.0	28.2	19.7	14.2
COV	41.2%	45.7%	49.0%	46.8%	40.6%	31.4%

A Figura 15 e a Figura 16 apresentam os gráficos box-plot para os grupos de fêmeas e machos, respectivamente. O grupo de fêmeas (Figura 15) apresenta um *outlier*, ou seja, um valor discrepante, representado pelo animal F10, apenas no tempo de coleta de 16 horas. No entanto, este animal não foi descartado neste momento para a realização das análises posteriores. Este grupo apresenta uma clara tendência de redução de variabilidade da média a medida que o tempo de jejum cresce.

O grupo dos machos (Figura 16) apresenta novos *outliers* e valores extremos, sendo todos eles representados diferentes animais. Nenhum destes animais foi retirado da amostragem neste momento para a realização das análises posteriores.

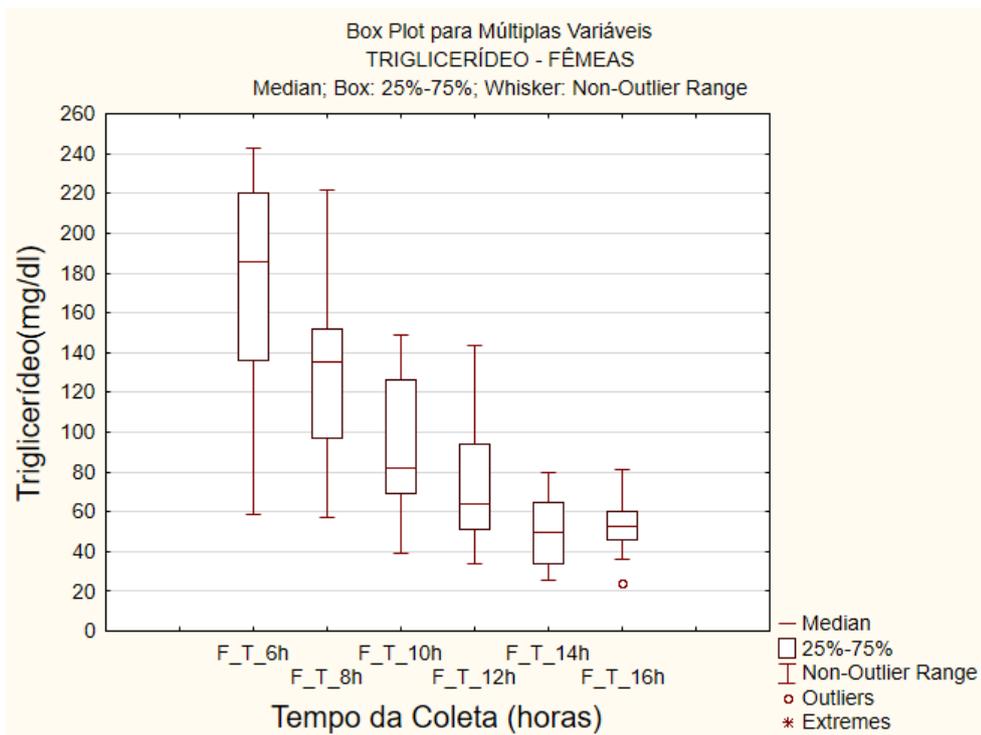


Figura 15. Gráfico box-plot que apresenta a distribuição dos dados do triglicerídeo das fêmeas para cada tempo de jejum realizado

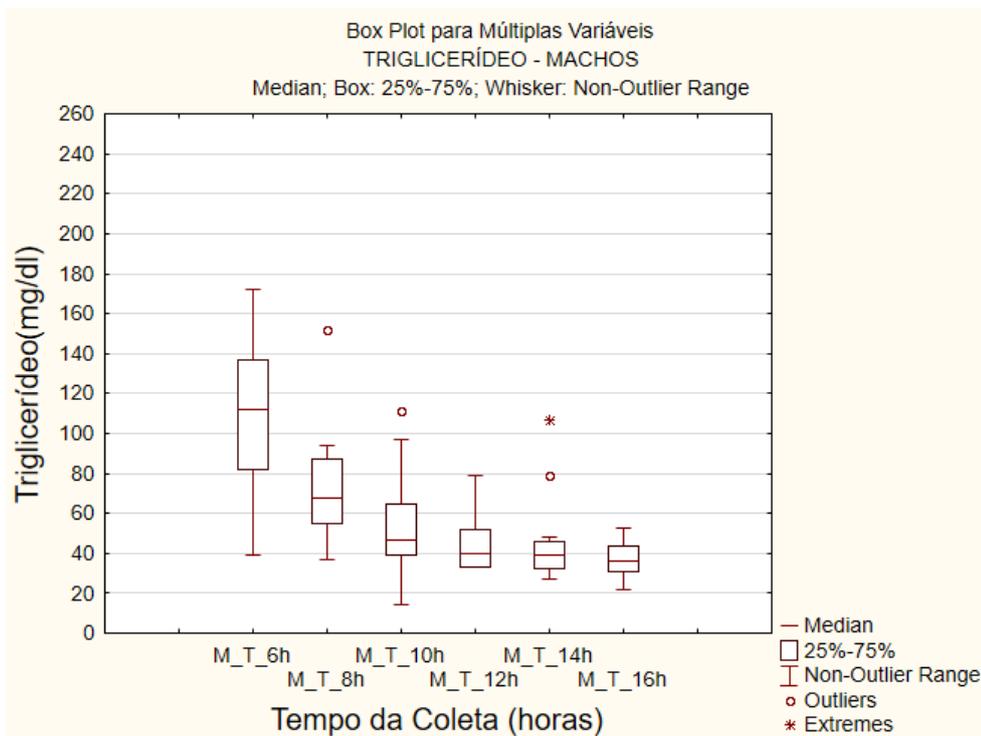


Figura 16. Gráfico box-plot que apresenta a distribuição dos dados do triglicerídeo das machos para cada tempo de jejum realizado

A Figura 17 apresenta o comportamento da média do triglicerídeo dosado ao longo dos tempos de cada coleta para os grupos de machos, fêmeas e todos os animais (machos e fêmeas juntos). É possível observar uma queda gradativa dos valores médios do triglicerídeo desde o tempo de coleta de 6 horas de jejum. Ligeira estabilização pode ser vista no grupo das fêmeas, porém, visualmente, o gráfico sugere a avaliação de tempos maiores para confirmação da estabilidade dos resultados. Assim como no colesterol, uma diferença importante na ordem de grandeza entre as médias dos grupos dos machos e fêmeas sugerem uma análise com maior detalhe, com a aplicação de um teste estatístico para verificar se de fato existe uma diferença significativa entre as médias.

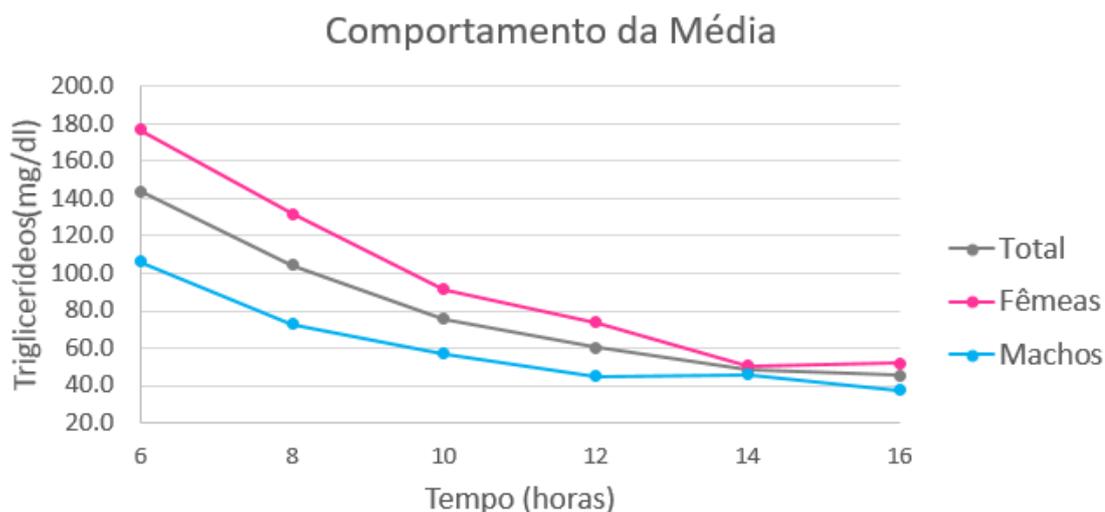


Figura 17. Comportamento da média do triglicerídeo para cada tempo de coleta de todos os animais, apenas fêmeas e apenas machos

A Figura 18 apresenta o comportamento do coeficiente de variação (COV) do triglicerídeo dosado ao longo dos tempos de cada coleta para os grupos de machos, fêmeas e todos os animais (machos e fêmeas juntos). O COV do grupo dos machos e fêmeas apresentam-se com comportamentos semelhante, exceto no tempo de 12 horas para os machos, onde há uma descontinuidade na tendência. A média observada do COV para as fêmeas ficou em 34,5%, e para os machos 39%. Em ambos os grupos, mesmo após as 14 horas de jejum, os coeficientes de variação ainda se mantêm com um valor alto.

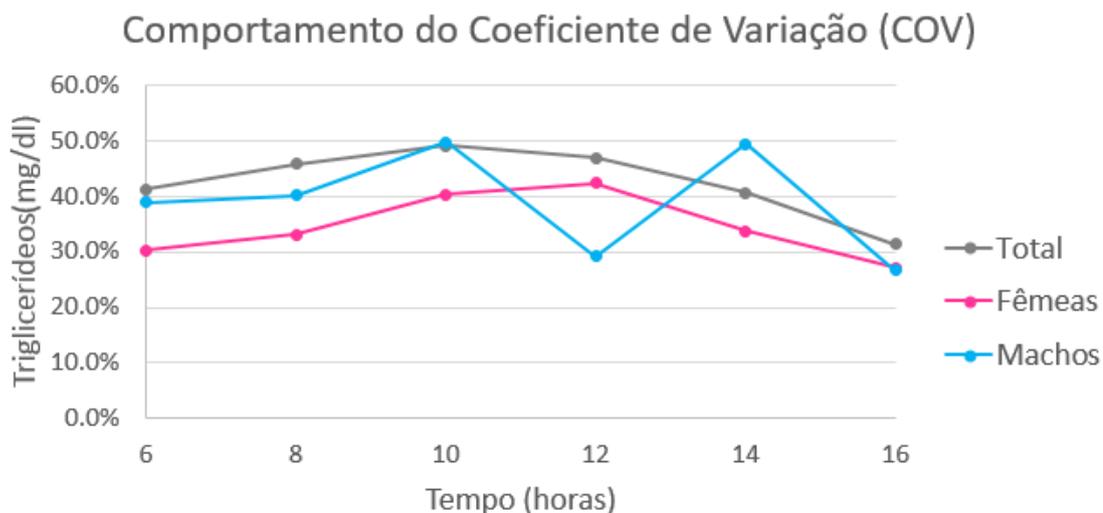


Figura 18. Comportamento do coeficiente de variação do triglicerídeo para cada tempo de coleta de todos os animais, apenas fêmeas e apenas machos

Os valores utilizados para construir os gráficos da Figura 17 e Figura 18 são apresentados na Tabela 10, Tabela 11 e Tabela 12.

Tabela 11. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de triglicerídeos para o grupo de fêmeas

Grupo de Fêmeas (15) – Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação						
Triglicerídeos totais (mg/dl). Referência: 20 a 112 mg/dL (KANEKO et al., 2008)						
Tempo de Coleta (horas)	6	8	10	12	14	16
Média	176.7	131.9	91.5	73.7	50.7	52.1
Desvio Padrão	53.5	43.7	36.8	31.2	17.1	14.2
CoV	30.3%	33.2%	40.2%	42.3%	33.8%	27.2%

Tabela 12. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da amostra de triglicerídeos para o grupo de machos

Grupo de Machos (13) – Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação Triglicerídeos totais (mg/dl). Referência: 20 a 112 mg/dL (KANEKO et al., 2008).						
Tempo de Coleta (horas)	6	8	10	12	14	16
Média	106.4	72.6	56.8	44.8	45.8	37.6
Desvio Padrão	41.4	29.2	28.3	13.1	22.6	10.0
CoV	38.9%	40.2%	49.7%	29.2%	49.4%	26.6%

A Figura 19 e Figura 20 apresentam os gráficos de probabilidade normal para os grupos de fêmea e macho, respectivamente, apresentando ao mesmo tempo uma tabela com os resultados do teste de normalidade Shapiro-Wilk e seus p-valores associados, para cada tempo de coleta.

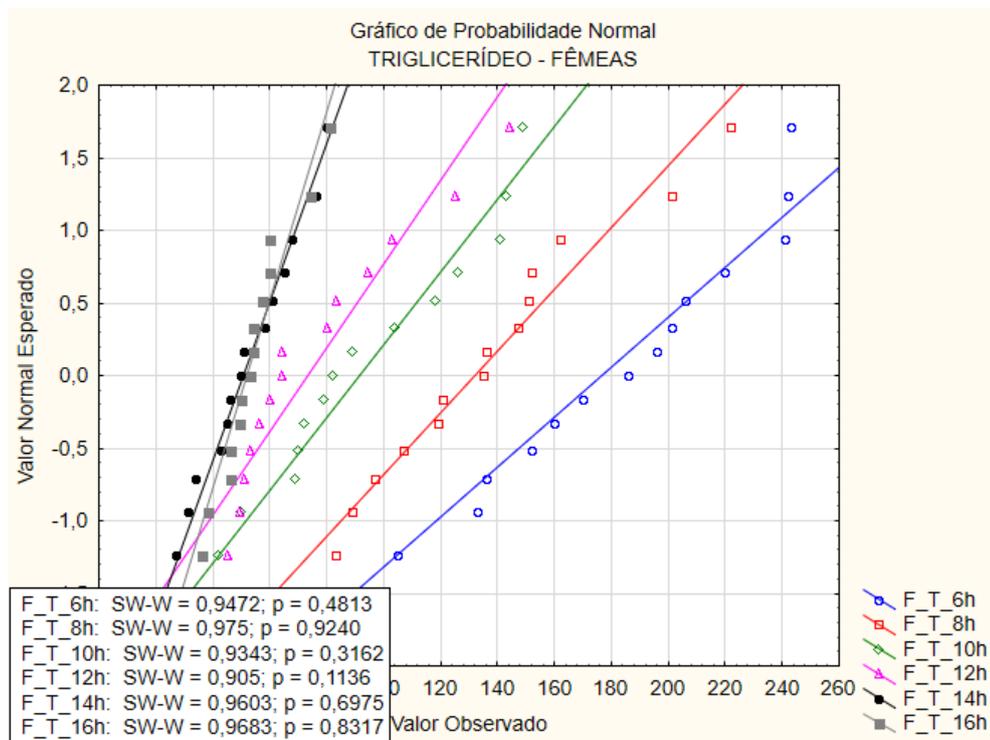


Figura 19. Gráfico de probabilidade normal aplicado ao grupo de fêmeas

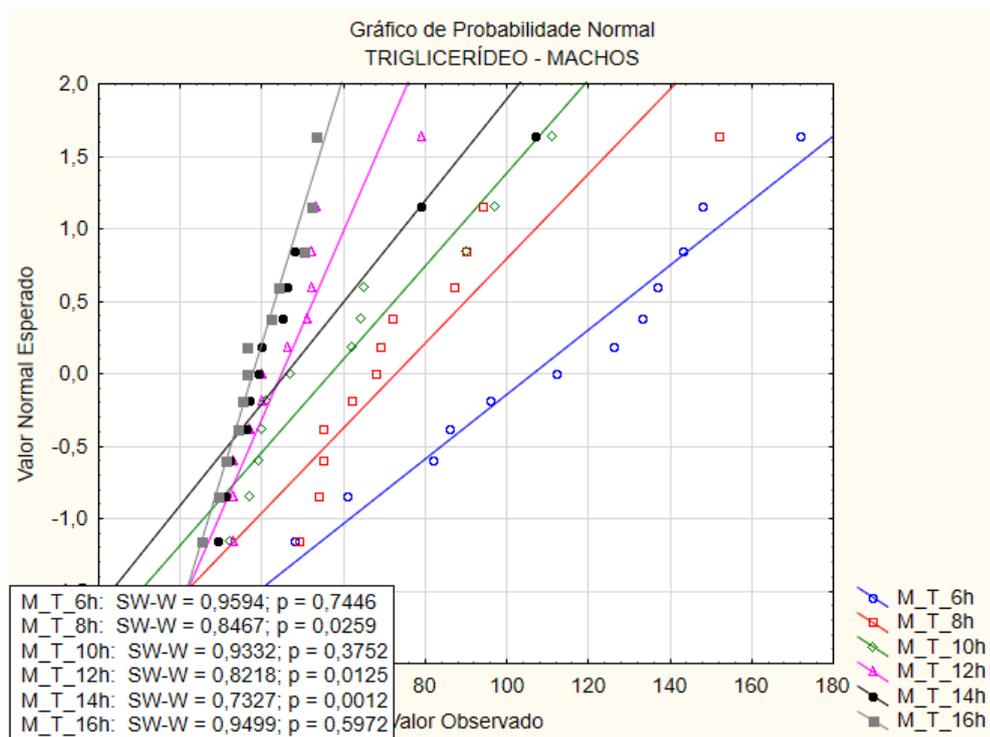


Figura 20. Gráfico de probabilidade normal aplicado ao grupo de machos

O grupo das fêmeas (Figura 19) apresentou sempre p-valores maiores que 5% (0,05). Os resultados indicam que a distribuição normal não pode ser considerada para caracterizar a distribuição do triglicerídeo deste grupo. O grupo dos machos (Figura 20) apresentam três tempos (8, 12 e 14 horas) com p-valores menores que 5% (0,05) e outros três (6, 10 e 16 horas) com maiores que 5%. Não foi observado uma unanimidade para atribuição de normalidade dos dados, assim sendo, este grupo não considera a distribuição normal como uma distribuição válida para a representação do triglicerídeo. Apenas os testes não-paramétricos serão utilizados para ambos os grupos, Mann-Whitney/Wilcoxon pareado.

Após primeira análise do comportamento da média dos animais (Figura 17), foi utilizado o teste estatístico Wilcoxon pareado para avaliar, com 95% de confiança, se existe uma diferença significativa entre as médias dos grupos de machos e fêmeas. O teste foi aplicado a cada tempo de coleta e os resultados são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Teste Mann-Whitney para avaliar a diferença das médias do triglicerídeo entre os grupos dos machos e fêmeas

z crítico = -1.644 (95% de confiança)	Teste Mann-Whitney -- Triglicerídeos					
Tempo de Coleta	6h	8h	10h	12h	14h	16h
Resultado do Teste (z)	-3.80	-4.08	-3.25	-3.75	-1.73	-3.48
Apresenta diferença estatística entre as médias do triglicerídeo dos machos e fêmeas?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
P-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Em todos os tempos de coleta o teste estatístico indica que existe diferença significativa entre as médias de triglicerídeo entre os grupos dos machos e das fêmeas. Isto indica que estes grupos não podem ser considerados advindos de uma mesma população e devem ser analisados separadamente. As análises posteriores de verificação quanto à diferença entre as horas de coleta do triglicerídeo serão realizadas de forma separada para cada grupo e não como um grupo total de animais que contem machos e fêmeas.

A Tabela 14 e Tabela 15 apresentam os resultados do teste estatístico Wilcoxon pareado aplicado aos grupos de fêmeas e machos, com o objetivo de verificar a existência de diferença entre as médias do triglicerídeo medidos entre os diferentes tempos de coleta.

Tabela 14. Teste estatístico Wilcoxon pareado para avaliar a diferença das médias entre os tempos de coleta do triglicerídeo no grupo fêmeas

W crítico variável (95% de confiança)	Teste Estatístico Wilcoxon (pareado) -- Triglicerídeo - FÊMEAS				
Tempo de Coleta	6hr-8hr	8hr-10hr	10hr-12hr	12hr-14hr	14hr-16hr
W crítico =	30.0	30.0	30.0	30.0	25.0
Resultado do Teste (w)	0.0	0.0	25.5	0.0	47.5
Apresenta diferença estatística entre as médias dos tempos de coleta do triglicerídeo das fêmeas?	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
P-valor	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.10

Tabela 15. Teste estatístico Wilcoxon pareado para avaliar a diferença das médias entre os tempos de coleta do triglicérideo no grupo machos

W crítico variável (95% de confiança)	Teste Estatístico Wilcoxon (pareado) -- Triglicérideo - MACHOS				
Tempo de Coleta	6hr-8hr	8hr-10hr	10hr-12hr	12hr-14hr	14hr-16hr
W crítico =	21.0	17.0	21.0	13.0	21.0
Resultado do Teste (w)	3.0	10.0	23.5	29.0	20.0
Apresenta diferença estatística entre as médias dos tempos de coleta do triglicérideo dos machos?	Sim	Sim	Não	Não	Sim
P-valor	<0.05	<0.05	<0.10	>0.10	<0.05

Segundo a Tabela 14, o grupo de fêmeas apresentou quedas significativas no valor do triglicérideo em todos os tempos de coleta exceto entre os tempos de 14 e 16 horas. Os resultados estatísticos confirmam o comportamento do gráfico apresentado na Figura 17, onde indica uma tentativa de estabilidade dos valores médios no tempo de coleta de 16 horas. O tempo mínimo indicado para avaliação dos triglicérideos em fêmeas é de 14 horas.

Situação semelhante acontece no grupo dos machos (Tabela 15). Os resultados estatísticos mostram que entre 6 e 8 horas e 8 e 10 horas é observada uma queda significativa dos níveis de triglicérideo, porém entre 10 e 12 horas e 12 e 14 horas não. A partir de 14 horas, o teste volta a indicar uma queda significativa, informando que o padrão estabilidade se situa um pouco além das 16 horas.

Segundo CAMPOS et al. (2005), os triglicérideos podem levar até 12 horas para retornar aos níveis de jejum após uma refeição, devido ao fato dos cães passarem a maior parte do dia em um estado de não-fadiga. As análises deste trabalho, no entanto, revelaram ser necessário um tempo maior que as 12 horas preconizados por CAMPOS et al. (2005). Segundo os testes realizados, o menor tempo para avaliação do triglicérideo em fêmeas é de 14 horas e em machos é a partir de 16 horas, uma vez que o padrão de estabilidade dos dados não foi atingido até este tempo.

4.3 AVALIAÇÃO CONJUNTA DE COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS

Alguns autores sugerem que o jejum alimentar para avaliação de colesterol seja de no mínimo 10 horas (NELSON; ELLIOT, 2010), outros realizam exames com 12 horas, visto avaliação em humanos (JOHNSON, 2005), enquanto XENOULIS et al (2015), considera um jejum alimentar de até 15 horas para diagnóstico de hipercolesterolemia. Os dados obtidos neste estudo, sugerem que os níveis de colesterol sanguíneo devam ser avaliados separadamente, entre machos e fêmeas, e demonstram diferenças significativas entre os diferentes tempos de jejum. Enquanto no grupo das fêmeas o jejum mínimo correto é de 10 horas, no grupo dos machos há um jejum mínimo de 12 horas e foi identificado que um tempo máximo deve ser estabelecido, a partir de avaliações com maior tempo de jejum (maiores que 14 horas). Como o estudo avaliou cães saudáveis, sem a presença de hiperlipidemia no momento dos exames, os dados condizem com os achados na literatura encontrados por JOHNSON (2005) NELSON; ELLIOT (2010), exceto pelo fato da identificação de se determinar um tempo máximo de jejum para os machos.

Em relação aos diferentes gêneros, fêmea e macho, PICCIONE et al. (2004) sugere que existam valores de referência diferentes apenas para triglicerídeos na abordagem inicial de pacientes saudáveis, e encontrou diferenças significativas nos valores de triglicerídeos nas fêmeas em relação aos machos, porém não para análise de colesterol. Neste estudo, não foi possível determinar o tempo mínimo para análise de triglicerídeos para machos, limitando-se a definição de um tempo de jejum maior que 16 horas (tempo máximo analisado), já o grupo de fêmeas foi identificado o tempo mínimo de 14 horas. Já PASQUINI et al. (2008) afirma que existem diferenças significativas no metabolismo lipídico, em especial nas lipoproteínas envolvidas no transporte de colesterol no plasma, mostrando que o sexo, idade, raça, estilo de vida e alimentar podem ser fatores que alterem os valores de colesterol. As análises em triglicerídeos não foram associadas.

Considerando que não há possibilidade de jejum alimentar menor do que 12 horas, a avaliação da concentração de colesterol sérico médio para este tempo no estudo em questão e em cães do grupo machos foi de 142,5 mg/dL, enquanto nas fêmeas foi de 162,5 mg/dL. Esses valores se encontram dentro do esperado para cães saudáveis de acordo com (KANEKO et al., 2008), onde os níveis de colesterol devem estar entre: 135 a 270mg/dL. Já para triglicerídeos, como os valores tenderam à estabilização próximo ao tempo de 16 horas, encontrou-se neste estudo valores referentes às fêmeas de 52,1mg/dL, enquanto machos 37,6mg/dL. Esses valores

também se encontram dentro da faixa de referência: 20 a 112mg/dL (KANEKO et al., 2008). Observa-se que os machos possuem valores lipídicos (colesterol total e triglicerídeos) menores do que fêmeas, sugerindo que elas possuam influências hormonais sobre o metabolismo lipídico durante a fase estral, o que não ocorre em machos.

Os cães utilizados neste estudo, possuíam uma frequência de alimentação a cada 24 horas, por este motivo os dados, referentes ao jejum alimentar, podem ter sido influenciados. Estudos posteriores devem ser feitos com cães que recebem alimentação a cada 12 horas, para investigar a interferência da frequência alimentar nas análises em diferentes tempos de jejum.

5 CONCLUSÕES

- O tempo mínimo de jejum para avaliação do perfil lipídico é diferente em cães machos e fêmeas, e devem ser analisados de forma individual quanto a sua interpretação.
- Os tempos mínimos de jejum encontrados para a avaliação do colesterol foram: Fêmeas: 10 horas e Machos: 12 a 14 horas.
- Os tempos mínimos de jejum encontrados para a avaliação do triglicerídeos foram: Fêmeas: 14 horas e Machos: > 16 horas.
- Novos estudos são necessários para avaliar a influência da frequência alimentar de cães saudáveis sobre a avaliação do perfil lipídico em determinados tempos de jejum.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AIRES M M et al., Cap 74: Controle Hormonal e Neural do Metabolismo Energético. IN: Fisiologia, 4ed. Ed. Guanabara Koogan. 2012.

AGUIRRE, A., CENTER, S.A., RANDOLPH, J., YEAGER, A., KEEGAN, A., HARVEY, H., ERB, H. **Gallbladder disease in Shetland Sheepdogs: 38 cases (1995–2005)**. J. Am. Vet. Med. Assoc. 231, 79–88, 2007.

BARRIE J., WATSON T. D. G., STEAR M. J., NASH A. S. **Plasma cholesterol and lipoprotein concentrations in the dog: The effects of age, breed, gender and endocrine disease**. J. Small. An. Pract. 34:507–512, 1993.

BANSAL S., BURING E. J., RIFAI N., MORA S., SACKS F., RIDKER M. P. **Fasting Compared With Nonfasting Triglycerides and Risk of Cardiovascular Events in Women**. J. A. M. A. Vol 298, No. 3, 2007.

BAUER, J.E. **Evaluation and dietary considerations in idiopathic hyperlipidemia in dogs**. J. Am. Vet. Med. Assoc. 206, 1684– 1688, 1995.

BAUER, J. E. **Comparative lipid and lipoprotein metabolism**. Vet. Clin. Pathol. 25, 49–56, 1996.

BAUER, J. E. **Lipoprotein-mediated transport of dietary and synthesized lipids and lipid abnormalities of dogs and cats**. J. Americ. Vet. Med. Assoc. 224, 668–675, 2004.

CAMPOS H, KHOO C, SACKS FM. **Diurnal and acute patterns of postprandial apolipoprotein B-48 in VLDL, IDL, and LDL from normolipidemic humans**. Atherosclerosis. 181(2):345-351, 2005.

CHUANG, J.H., SHIEH, C.S., CHANG, N.K., CHEN, W.J., LO, S.K. **Metabolic effect of parenteral nutrition in dogs with obstructive jaundice**. J. Amer. College of Nutrition 14, 197–201, 1995.

COOK, A.K., BREITSCHWERDT, E.B., LEVINE, J.F., BUNCH, S.E., LINN, L.O. **Risk factors associated with acute pancreatitis in dogs: 101 cases (1985–1990)**. J.Americ. Vet. Med. Assoc. 203, 673–679, 1993.

CRISPIN, S. M. **Ocular manifestations of hyperlipoproteinemia**. J. Small An. Pract. 34, 500-506, 1993.

DIXON, R.; REID, S.; MOONEY, C. **Epidemiological, clinical, hematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism**. The Veterinary Record, 145, p. 481-487, 1999.

DIBARTOLA, S.P., TARR, M.J., WEBB, D.M., GIGER, U. **Familial renal amyloidosis in Chinese Shar-Pei dogs**. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 197, 483–487, 1990.

DOWNS, L. G., CRISPIN, S. M., LEGRANDEDEFRETIN, V. **The effect of dietary changes on plasma lipids and lipoproteins of six Labrador Retrievers**. Research in Veterinary Science 63, 175-181, 1997.

ELLIOTT K F., RAND J S., FLEEMAN M L., MORTON M J., MARKWELL T P. **Use of a meal challenge test to estimate peak postprandial triglyceride concentrations in dogs**. AJVR, Vol 72, No. 2, February 2011.

FORD, R.B. **Clinical management of lipemic patients**. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 18, 1053–1060, 1996.

FORD, R.B. **Idiopathic hyperchylomicronemia in Miniature Schnauzers**. J. Small An. Pract. 34, 488–492, 1993.

GINZINGER D. G., CLEE S. M., DALLONGEVILLE J, et al. **Lipid and lipoprotein analysis of cats with lipoprotein lipase deficiency**. Eur. J. Clin. Invest 29: 17–26, 1999.

GINSBERG, H. N. **Lipoprotein physiology**. Endoc. and Metab. Clin. North Am. 27, 503–519, 1998.

GOMES P. F.,¹ DO CARMO T. M., **Dislipidemia pós-prandial e doença cardiovascular**. Rev Bras Nutr Clin 2006; 21(1):60-71, 2006.

GUYTON, A. C., HALL, J.E. **Digestion and absorption in the gastrointestinal tract**. IN: Guyton, A.C., Hall, J.E. (Eds.), Textbook of Medical Physiology. WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 2000.

HESS, R.S., KASS, P.H., VAN WINKLE, T.J. **Association between diabetes mellitus, hypothyroidism or hyperadrenocorticism, and atherosclerosis in dogs**. J. Vet. Med. Med. Sci. 17, 489–494, 2003.

JEUSETTE, I., GRAUWELS, M., CUVELIER, C., TONGLET, C., ISTASSE, L., DIEZ, M. **Hypercholesterolaemia in a family of rough collie dogs**. J. Small An. Pract. 45, 319–324, 2004.

JEUSETTE, I.C., LHOEST, E.T., ISTASSE, L.P., DIEZ, M.O. **Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs**. Am. J. Vet. 66, 81–86, 2005.

KANEKO J J.; HARVEY W J., BRUSS L M. IN: **Cap.4 Lipids and Ketones** IN: Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 6 ed.-Academic Press, 2008.

KAWASUMI K., KASHIWADO N., OKADA. Y., MASAKI S. SASAKI. Y., IWAZAKI. E., MORI. Y. I., ARAI. T., **Age effects on plasma cholesterol and triglyceride profiles and metabolite concentrations in dogs**. BMC Veterinary Research, 10-57, 2014.

KLUGER E. K, et al: **Evaluation of two portable meters for determination of blood triglyceride concentration in dogs**. Am. J. Vet. Res. 71:203, 2010.

LANGSTED A., FREIBERG J., NORDESTGAARD B. **Fasting and Nonfasting Lipid Levels: Influence of Normal Food Intake on Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and**

Cardiovascular Risk Prediction. 2008. <http://circ.ahajournals.org>. Acessado em 11 de Dezembro de 2016.

LITTMAN, M.P., DAMBACH, D.M., VADEN, S.L., GIGER, U. **Familial protein-losing enteropathy and protein-losing nephropathy in Soft Coated Wheaten Terriers: 222 cases (1983–1997).** J. Vet. Med. Sci. 14, 68–80, 2000.

LIU SK, TILLEY LP, TAPPE JP, FOX PR. **Clinical and pathological findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970–1983).** J Am Vet Med Assoc; 189:227–232, 1986.

THRALL M A., WEISER G., ALLISON R W., CAMPBELL W T. Avaliação laboratorial dos lipídeos. IN: **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** p.416-430. Roca, 2007.

MOHANLAL N., HOLMAN R. R. A standardized triglyceride and carbohydrate challenge: the oral triglyceride tolerance test. Diabetes Care, 27(1):89-94, 2004.

MOONEY T. C., PETERSON E. M., Cap. 16 Hiperadrenocorticism em cães. IN: Manual de Endocrinologia em Cães e Gatos. 4 edição. Ed Roca. pp.202-220. 2015.

NELSON, W. R., DELANEY, J. S., ELLIOT, A. D. Parte sete: Distúrbios metabólicos e eletrolíticos. IN: Medicina Interna de Pequenos Animais Pag. 860-866. 4ª edição. Elsevier, 2010.

NELSON W. R. Chapter 8: **Endocrine, Metabolic, and Lipid Disorders.** IN: NELSON; COUTO. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. 5. ed. Elsevier Saunders, 2012.

NIETO, C.G., BARRERA, R., HABELA, M.A., NAVARRETE, I., MOLINA, C., JIMENEZ, A., SERRERA, J.L. **Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*.** Veterinary Parasitology 44, 175–182, 1992.

PASQUINI, A. E. LUCHETTI; CARDINI. G. **Plasma lipoprotein concentrations in the dog: the effects of gender, age, breed and diet** J Anim Physiol Anim Nutr. 92, 718–722, 2008.

PENA C, SUAREZ L, BAUTISTA I, et al. **Relationship between analytic values and canine obesity.** J Anim Physiol Anim Nutr. 2.92:324–5, 2008.

PICCIONE G., FAZIO F., GIUDICE E., GRASSO F., CAOLA G. **Blood Lipids, Fecal Fat and Chymotrypsin Excretion in the Dog: Influence of Age, Body Weight and Sex.** . Vet. Med. Sci. 66(1): 59–62, 2004.

PICCIONE G., BERTOLUCCI C., FAZIO F. **Daily Rhythms of Serum Lipids in Dogs: Influences of Lighting and Fasting Cycles.** Am. Assoc. Lab. An. Sci. Vol 58, No 5, Pages 485–489, 2008.

REDKER M P. **Fasting versus Nonfasting Triglycerides and the Prediction of Cardiovascular Risk: Do We Need to Revisit the Oral Triglyceride Tolerance Test?** Clinical Chemistry 54:1 2008.

ROGERS, W.A., DONOVAN, E.F., KOCIBA, G.J. **Idiopathic hyperlipoproteinemia in dogs.** J. American An. Hosp. Association. 166, 1087– 1091, 1975.

RIFAI, N., BACHORIK, P.S., ALBERS, J.J. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (Eds.), **Tietz Textbook of Clinical Chemistry.** WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 809–861, 1999.

SAHARIA, P., MARGOLIS, S., ZUIDEMA, G.D., CAMERON, J.L., **Acute pancreatitis with hyperlipidemia: studies with an isolated perfused canine pancreas.** Surgery 82, 60–67, 1977.

SATO, K., AGOH, H., KANESHIGE, T., HIKASA, W., KAGOTA, K. **Hypercholesterolemia in Shetland Sheepdogs.** Journal of Veterinary Medical Science 62, 1297–1301, 2000.

SCHERK, M.A., CENTER, S.A. Toxic, metabolic, infectious, and neoplastic liver diseases. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), **Textbook of Veterinary Internal Medicine.** Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 1464–1478, 2005.

SCOTT A. M.;STOCKHAM L. S. Cap 16: Lipídios. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária** 2 eds., Guanabara Koogan, 2012.

THRALL M. A., WEISER G., ALLISON W. R., CAMPBELL W. T. **Veterinary hematology and Clinical Chemistry. CAP 31. Laboratory Evaluation of Lipids** 2 Ed. 2012

TIDHOLM, A., JONSSON, L. **A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases).** J. American An. Hosp. Association 33, 544–550, 1997.

TSIMIHODIMOS V., DOUNOUSI E., SIAMOPOULOS C. K. **Dyslipidemia in chronic kidney disease: an approach to pathogenesis and treatment.** Am J Nephrol 28: 958–73, 2008.

USUI. S., YASUSHIM. M., HIDEMI Y., NOBUAKI A., YUZO K., **Dog Age and Breeds Associated with High Plasma Cholesterol and Triglyceride Concentrations** J. Vet. Med. Sci. 76(2): 269–272, 2014.

USUI S.,YASUDA S., KOKETSU1., Y. **Lipoprotein cholesterol and triglyceride concentrations associated with dog body condition score; effect of recommended fasting duration on sample concentrations in Japanese private clinics.** J. Vet. Med. Sci. 77(9): 1063–1069, 2015.

XENOULIS, P.G., SUCHODOLSKI, J.S., LEVINSKI, M.D., STEINER, J.M. **Investigation of hypertriglyceridemia in healthy Miniature Schnauzers.** J. Vet. Med. Sci 21, 1224–1230, 2007.

XENOULIS, G. P., STEINER, J. M. **Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs.** The Veterinary Journal 183, 12–21. Texas. 2010.

XENOULIS, P. G., LEVINSKI, M. D., SUCHODOLSKI, J. S., et al. **Association of hypertriglyceridemia with insulin resistance in healthy Miniature Schnauzers.** J. American An. Hosp. Association, 238, 1011-1016, 2011.

XENOULIS, P. G., STEINER, J. M. **Canine hyperlipidemia**. J. Small An, Pract. 56, 595–605, Athens, Greece, 2015.

WADA, M., MINAMISONO, T., EHRHART, L.A., NAITO, H.K., MISE, J. **Familial hyperlipoproteinemia in Beagles**. Life Sciences 20, 999–1008, 1977.

WATSON, T.D.G., BARRIE, J. **Lipoprotein metabolism and hyperlipemia in the dog and cat – a review**. J. Small An. Pract. 34, 479–487, 1993.

WILLIAMS, D.A., STEINER, J.M. Canine pancreatic disease. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 1482–1488, 2005.

YILMAZ, Z., SENTURK, S. **Characterization of lipid profiles in dogs with parvoviral enteritis**. J. Small An. Pract 48, 643–650, 2007.

VITALE, C. L.; OLBY, N. J. **Neurologic dysfunction in hypothyroid, hyperlipidemic Labrador Retrievers**. J. Vet. Med. Sci. 21, 1316-1322, 2007.

7 ANEXOS

ANEXO A. Lista dos cães selecionados para o experimento (Identificados com numeração, nome e localização na baía selecionada no LQEPV em canis individuais)

NUMERO	CHIP	SEXO	LOCALIZAÇÃO
1M	459366 (CAIO)	M	B08
2M	595969 (ÚNICO)	M	B11
3M	288437 (EURICO)	M	C18
4M	035750 (OSCAR)	M	D06
5M	288429 (OLIE)	M	D05
6M	604399 (EISTEN)	M	C14
7M	257913 (LUIGI)	M	D18
8M	604418 (GUERREIRO)	M	D01
9M	288417 (CARLOS DAN.)	M	D03
10M	503439 (CHICO)	M	B18
11M	595290 (SIMON)	M	A18
12M	594686 (SULTÃO)	M	B17
13M	236368 (ALFREDO)	M	D18
1F	288361 (ZARA)	F	D07
2F	459391 (AMELIA)	F	D13
3F	459418 (BOEMIA)	F	C3
4F	503660 (MARGOT)	F	C08
5F	044482 (LUMA)	F	B07
6F	604238 (SORRISO)	F	A11
7F	458673 (CACAU)	F	B07
8F	288364 (LUPITA)	F	D09
9F	257673 (JENNY)	F	C20
10F	604238 (FANTA)	F	A11
11F	288363 (GAYA)	F	B14
12F	288372(KIARA)	F	D09
13F	503558 (MATILDA)	F	C04
14F	595950 (M APARECIDA)	F	C16
15F	503648 (XUXUZINHA)	F	C13

ANEXO B. Declaração de Aprovação da CEUA



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no
Uso de Animais
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos níveis de colesterol e triglicérides após diferentes tempos de jejum em Beagles saudáveis.", protocolada sob o CEUA nº 7495280616, sob a responsabilidade de **Júlio Israel Fernandes e equipe; Rafaela Bruno Faria Pisani** - 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 Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 18/10/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of cholesterol and triglycerides after different times in healthy fasting Beagles.", utilizing 30 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7495280616, under the responsibility of **Júlio Israel Fernandes and team; Rafaela Bruno Faria Pisani** - 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 Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 10/18/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [08/2016](#) a [09/2016](#) Área: [Clínica Médica](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Cães](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 6 anos](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Beagle](#)

Peso: [10 a 16 kg](#)

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro