

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LAURA SOLHA BASILE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE DIABETES MELLITUS INSULINODEPENDENTE E
VACINAÇÃO EM CÃES**

**UBERLÂNDIA
2019**

LAURA SOLHA BASILE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE DIABETES MELLITUS INSULINODEPENDENTE E
VACINAÇÃO EM CÃES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do grau de Médica Veterinária.

Orientadora: Profa. Ma. Dra. Sofia Borin-Crivellenti

UBERLÂNDIA
2019

LAURA SOLHA BASILE

ASSOCIAÇÃO ENTRE DIABETES MELLITUS INSULINODEPENDENTE E
VACINAÇÃO EM CÃES

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial à
obtenção do grau de Médica Veterinária.

Orientadora: Profa. Ma. Dra. Sofia Borin-
Crivellenti

Uberlândia, 08 de julho 2019

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a Sofia Borin-Crivellenti
(FAMEV/ UFU)

Prof^a Dr^a Carolina Franchi João
(FAMEV/ UFU)

Doutoranda M^a Paula Barbosa Costa
(Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAMEV/UFU)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que possibilitou que tudo isso acontecesse. A minha família, que me apoiou em todos os momentos e nunca mediu esforços para me ajudar nessa e em todas as etapas da minha vida. Aos meus cachorros que foram determinantes para escolha da minha carreira.

Agradeço aos professores, em especial a minha orientadora Prof^a Dr^a Sofia Borin-Crivellenti, que me ajudou em todos os processos deste projeto e sempre esteve presente para me ajudar, ao Prof. Dr. Tiago Mineo do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas UFU, que ajudou na idealização deste trabalho, a doutoranda Paula Barbosa Costa, que me auxiliou na elaboração do texto . Ao Médico Veterinário Gabriel Müller e a Médica Veterinária Patrícia Alves, pela ajuda na coleta dos dados dos animais diabéticos.

A todos os tutores que participaram da pesquisa realizada e permitiram a conclusão deste estudo. Ao programa CNPq/PIBIC pelo financiamento do projeto de pesquisa e a Universidade Federal de Uberlândia pela concessão da bolsa de iniciação científica.

RESUMO

A inoculação de antígenos no organismo tem como intuito a produção de anticorpos específicos, entretanto, esta pode causar eventos adversos, variando desde a composição vacinal a erros no processo de imunização. Diversos tipos de reações adversas causadas pelo excesso vacinal são relatados, e dentre as doenças autoimunes, uma possível doença é o diabetes mellitus insulino dependente (DMID), que pode advir da destruição imunomediada das células β -pancreáticas. Assim, este estudo teve como principal objetivo tentar identificar uma possível associação entre a vacinação e o desenvolvimento desta doença em cães. Para tanto, o histórico clínico e vacinal de 20 cadelas portadoras de DMID e 80 cadelas controles, selecionadas de acordo com os assinalamentos da doença foram obtidos e analisados por meio de diversos métodos estatísticos.

Este por sua vez teve a finalidade de verificar a relação entre o DMID e as demais variáveis estudadas, bem como de se obter um modelo estatístico para descrição da probabilidade da ocorrência do DMID destas variáveis. A quantidade total de doses vacinais recebidas pelas cadelas apresentou significativa associação com o desenvolvimento do DMID ($p < 0,0001$), associado à outros fatores já conhecidos, tais como dietas mistas ($p < 0,042$), fêmeas inteiras ($p < 0,016$) e com idade superior a 4 anos ($p < 0,005$). Dentro dos modelos obtidos, verificou-se que fêmeas inteiras, com idade entre 4 a 10 anos, que são alimentadas com alimentos mistos (ração e comida caseira) e que já receberam mais de 17 doses de vacina apresentaram 4,2 vezes mais chance de ter DM que a população em geral (Sen75%, Esp75%). Assim, os resultados preliminares aqui obtidos de maneira inédita, apontam para um possível envolvimento de autoimunidade relacionada a vacinação como fator associado ao DM canino, os quais merecem atenção e investigações futuras.

Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 1, imunomediada, imunização, pâncreas endócrino

ABSTRACT

The inoculation of antigens in the organism aims to produce specific antibodies, however, this can cause adverse events, ranging from the vaccine composition to errors in the immunization process. Several types of adverse reactions caused by excess vaccination are reported, a possible disease is insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), which results from the immune-mediated destruction of beta-pancreatic cells. Thus, this study aimed to identify a possible association between vaccination and the development of this disease in dogs. To that end, the clinical and vaccine histories of 20 female dogs with IDDM and 80 control dogs, selected according to disease indications, were obtained and analyzed by means of several statistical methods.

This in turn had the purpose of verifying the relationship between IDDM and the other variables studied, as well as to obtain a statistical model to describe the probability of the occurrence of IDDM of these variables. The total number of vaccine doses received by bitches was significantly associated with the development of IDDM ($p < 0.0001$), associated to other known factors such as mixed diets ($p < 0.042$), whole females ($p < 0.016$), and with age greater than 4 years ($p < 0.005$). Within the obtained models, whole females, aged 4 to 10 years, fed with mixed foods (ration and home food) and who had received more than 17 doses of vaccine were 4.2 times more likely to have DM than the general population (Sen75%, Esp75%). Thus, the preliminary results obtained here unpublished, point to a possible involvement of autoimmunity related to vaccination as a factor associated with canine DM, which deserve attention and future research.

Keywords: endocrine pancreas, immune-mediated, immunization, insulin dependent diabetes.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Quantidade de doses totais recebidas e frequência de administração vacinal das cadelas diabéticas e do grupo controle.....	20
Tabela 2 - Modelo inicialmente gerado a partir da análise de regressão logística para discriminação de cadelas com diabetes mellitus e controles.....	21
Tabela 3 – Modelo desenvolvido a partir da análise de regressão logística para discriminação de cadelas com diabetes mellitus e controles considerando o <i>cut-off</i> de 17 doses de vacina.....	22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Diabetes Mellitus	10
2.2 Doenças autoimunes em cães	11
2.3 Vacinação em cães	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
4 RESULTADOS	18
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXO 1	30

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma das doenças endócrinas mais comuns em cães de meia-idade a idosos. Caracteriza-se por um distúrbio do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas causado por uma deficiência insulínica absoluta ou relativa. Os cães apresentam quase que exclusivamente o diabetes mellitus insulino dependente, que se caracteriza por capacidade secretora de insulina bastante reduzida ou ausente pelo pâncreas oriunda, primordialmente, de lesão às células β pancreáticas (NELSON, 2000; FELDMAN; NELSON, 2004; BORIN-CRIVELLENTI, 2015; GILOR et al., 2016).

Recente e relevante revisão que trata da importância do estabelecimento da classificação do DM em medicina veterinária desenterrou importantes lacunas da doença em pequenos animais. O sistema de classificação de diabetes mellitus insulino dependente (DMID) e não insulino dependente (DMNID) foi adotado pela medicina veterinária no século 20 e, como na medicina humana, foi posteriormente substituído pela terminologia tipos 1 e 2, respectivamente, independentemente da etiopatogenia subjacente. Tal fato pode ser atribuído, em parte ao nível ainda modesto (mas crescente) de compreensão dos processos de doença subjacentes no campo da diabetologia veterinária.

Diversas questões surgem ao tentar aplicar a classificação atual do DM baseada na etiopatogenia a animais de companhia. Especialmente no tocante as causas reais da DM em pequenos animais e quais fatores, efetivamente, afetam o tratamento desta importante doença (GILOR et al., 2016), elucidando que uma melhor compreensão da etiopatogenia da DM em cães e gatos permitiria, talvez, intervenções em estágios iniciais, levando a uma progressão mais lenta, evitando a dependência da insulina ou até mesmo prevenindo a DM completamente.

Evidências sorológicas e histológicas de autoimunidade como possível causa de DM em cães são alvos contínuos de pesquisas na área. Diversos estudos constataram destruição autoimune de células β pancreáticas mediada por células em até 50% de cães diabéticos (ALEJANDRO et al., 1988; HOENIG; DAWE, 1992; DAVISON et al., 2008a; DAVISON et al., 2008b; DAVISON; HERRTAGE; CATCHPOLE, 2011).

Mesmo, que alguns estudos não tenham encontrado evidências de autoimunidade (GEPTS; TOUSSAINT, 1967; HAINES, 1986; LING et al., 1977;

AHLGREN et al., 2014), sabe-se que a presença de autoanticorpos e de um infiltrado inflamatório depende do conteúdo residual de insulina das células, e que esta, raramente é detectada quando as células β tornam-se deficientes em insulina (COPPIETERS; VON HERRATH, 2009). Portanto, uma explicação plausível para a relativa falta de evidências de autoimunidade em cães diabéticos em tais estudos, pode estar relacionada à realização de testes em amostras de soros ou tecidos em estádios tardios da doença, nos quais os teores de insulina das ilhotas já se encontram muito baixos para que o sistema imune determine uma resposta perceptível (GILOR et al., 2016).

A vacinação tem sido associada a ocorrência de uma série de doenças autoimunes. Particularmente em cães, inclui-se a anemia hemolítica imunomediada (IMHA) (DUVAL; GIGER, 1996), trombocitopenia imunomediada (IMTP) (MCANULTY; RUDD, 1985), polineurite e poliartrite (KOHN et al., 2003). Existem poucos dados que definem o mecanismo pelo qual essas associações podem surgir, embora, hipoteticamente, um número de possibilidades possa ser proposto, incluindo a perturbação da imunorregulação pela vacinação, ativação imune inespecífica via adjuvantes derivados de microrganismos expostos a proteína de tecidos de reatividade cruzada incorporada em vacinas e o mimetismo molecular (SCHATTNER, 2005).

Assim, este estudo pretendeu primordialmente identificar se a vacinação pode ser um fator de risco a ser considerado para o desenvolvimento do diabetes mellitus em cães, já que é considerada uma das doenças mais comuns na rotina de atendimento de animais portadores de endocrinopatias. Ademais, os resultados aqui obtidos poderão gerar futuras pesquisas não somente sobre tal doença endócrina, mas sobre o desenvolvimento de medidas e protocolos vacinais diferenciados em animais de companhia, e quiçá em serem humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus

O diabetes *mellitus* (DM) é, de acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde (2016), um importante problema de saúde pública e uma das quatro doenças não transmissíveis escolhidas para intervenção de caráter prioritário. De acordo com as estimativas, de 1980 a 2014 o número de adultos que possuem diabetes cresceu de 108 milhões para 422 milhões de pessoas. Além disso, 1,5 milhões de pessoas morreram em 2012 por diabetes. Em proporções de incidência menor, mas de grande importância na rotina médico-veterinária, o DM é também considerado uma das doenças endócrinas mais comuns de cães e gatos de meia-idade a idosos (NELSON, 2000; BORIN-CRIVELLENTI, 2015).

O DM corresponde a um distúrbio do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas causado por uma deficiência insulínica relativa ou absoluta (BORIN-CRIVELLENTI, 2015). Esta deficiência de insulina que ocorre é resultado da incapacidade das ilhotas pancreáticas em secretar insulina e/ou de ação deficiente da insulina nos tecidos. Em cães, esta doença predominantemente de origem autoimune é uma das endocrinopatias mais comuns e pode ser fatal se não for diagnosticada e adequadamente tratada, uma vez que os animais ficam completamente dependentes de insulino-terapia para sobreviver (NELSON, 1994).

Os aspectos fundamentais que permitem um diagnóstico correto do DM em cães são os sinais clínicos clássicos de poliúria e polidipsia, polifagia e perda de peso, podendo ainda ser encontrado definhamento da musculatura dorsal, pelame oleoso e catarata (BORIN-CRIVELLENTI, 2015). Esta endocrinopatia também apresenta alterações clínico-patológicas concomitantes aos sinais clínicos indispensáveis ao diagnóstico, como hiperglicemia (>200 mg/dL) e glicosúria (PÖPPL; GONZALÉZ, 2005). Fontes literárias destacam que raças como Malamute do Alaska, Spitz, Golden Retriever, Whippet, Schnauzer miniatura, Pinscher, Terriers, (DE FARIA, 2007), assim como Poodle, Teckel e Beagle apresentam maior risco a diabetes (BORIN-CRIVELLENTI, 2015). A maioria dos cães tem entre 4 e 14 anos de idade no momento em que o DM é diagnosticado (NELSON; COUTO, 2015) sendo as fêmeas acometidas mais do que os machos (BORIN-CRIVELLENTI, 2015). Diversos fatores são citados na literatura como predisponentes ao desenvolvimento da doença em cães, sendo os

mais importantes a insulite imunomediada, obesidade, antagonismos hormonais como o diestro, terapia com fármacos (por exemplo glicocorticoides, progestágenos), infecções e doenças intercorrentes (tais como hiperadrenocorticismo, acromegalia, pancreatite), hiperlipidemia e predisposição genética (FELDMAN; NELSON, 2004).

O desenvolvimento do DM insulino dependente foi conceitualmente dividido em seis estágios. O primeiro é a suscetibilidade genética, o segundo envolve um evento disparador que leva a autoimunidade das células beta. O terceiro é o período da autoimunidade ativa, no qual ainda é mantida a secreção normal de insulina. Durante o quarto estágio, persistem as anormalidades imunológicas, mas a secreção de insulina estimulada pela glicose se perde progressivamente, a despeito da manutenção da euglicemia. O diabetes evidente desenvolve-se no quinto estágio, embora permaneça alguma secreção residual de insulina, quando a destruição completa das células beta se completa no último estágio (NELSON, 1992).

2.2 Doenças autoimunes e vacinação em cães

A função imunológica tem sido conceitualmente dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa uma resposta rápida e padronizada a um número grande, mas limitado, de antígenos, e está presente em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). Já a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, como os linfócitos, que são os principais envolvidos neste processo. Porém, as células apresentadoras de antígenos (APCs) também desempenham papel fundamental em sua ativação, apresentando antígenos para os linfócitos T (DELVES; ROITT, 2000).

A imunização, ao inocular o antígeno no organismo, tem por objetivo gerar células de memória, ou seja, células T e células B. Essas são responsáveis por fornecer uma imunidade rápida e eficiente em um segundo contato com antígenos específicos. Entretanto, esta pode causar eventos adversos, variando de propriedades inerentes de vacinas a algum erro no processo de imunização (BEREK; ZIEGNER, 1993; SANDERS; MAKGOBA; SHAW, 1988). Após a vacinação, o sistema imunológico tem uma tarefa assustadora de manter a saúde enquanto enfrenta a exposição contínua ao mundo microbiano (KHERLI et al., 1998).

A resposta imunológica de um animal à vacinação é semelhante à sua resposta à doença natural e envolve aspectos não específicos e específicos da doença imune (DHEIN; GORHAM, 1986). Se a imunossupressão ocorre no momento da vacinação, a vacina pode não induzir uma resposta imunológica adequada (ROTH, 1991). Muitos tipos de respostas adversas foram relatados após a vacinação, variando de reação leve a efeitos colaterais mais graves. A anafilaxia e algumas doenças autoimunes, como anemia hemolítica imunomediada, são reações adversas à vacinação encontradas com frequência na literatura (DUVAL; GIGER, 1996).

O mecanismo (ou mecanismos) das reações autoimunes após a imunização ainda não foi elucidado. Uma das possibilidades é o mimetismo molecular; quando existe uma similaridade estrutural entre algum antígeno viral (ou outro componente da vacina) e um autoantígeno. Esta semelhança pode ser o gatilho para a reação autoimune (SHOENFELD; ARON-MAOR, 2000). O vírus da rubéola é um possível agente ambiental que pode estar envolvido no desencadeamento da autoimunidade às células das ilhotas pancreáticas, levando ao diabetes mellitus tipo 1 (insulinodependente) em humanos (BODANSKY et al., 1990).

No tocante ao diabetes mellitus (DM) em humanos, especificamente, múltiplos mecanismos diferentes têm sido propostos para explicar a sua associação com vacinas (CLASSEN; CLASSEN, 2001). Um deles se baseia no fato de que o mecanismo pelo qual a vacina pode estimular o sistema imunológico é através da ativação de macrófagos (SZELACHOWSKA; KRETOWSKY; KINALSKA, 1997). Dados que apoiam uma relação causal se baseiam na observação de que seres humanos em risco para a doença, aumentaram a atividade de macrófagos (HUSSAIN et al., 1998) e que modelos animais também indicam que os macrófagos estão envolvidos no início do diabetes (KOLB-BACHOFEN; KOLB, 1989).

A questão de uma conexão entre vacinação e doença autoimune é cercada de controvérsias. Esteve em curso um debate sobre a causalidade entre as vacinas, como o vírus do sarampo e dos anti-hepatites B (VHB) e a esclerose múltipla (EM) em humanos. Anticorpos cerebrais, bem como sintomas clínicos, foram encontrados em pacientes vacinados contra essas doenças. Outras doenças auto-imunes também já foram associadas à vacinação; fenômenos que variam desde a produção de autoanticorpos até o desenvolvimento de doenças completas, como artrite reumatoide (AR), estão sendo relacionados ao toxóide tetânico, vacinas contra influenza, vacina contra poliomielite dentre outros (SHOENFELD; ARON-MAOR, 2000).

Embora suspeitada a existência de uma associação, a relação da autoimunidade com a vacinação ainda não está clara em pequenos animais. Atualmente há uma evidência fraca e baseada em uma observação anedótica de uma associação temporal da doença imunomediada com a vacinação em alguns estudos, mas não em outros. Tem sido difícil estabelecer uma relação causa e efeito definitiva devido à alta frequência de vacinação e a baixa prevalência dos efeitos adversos (NELSON; COUTO, 2015). Embora os dados correspondentes à relação entre vacinação e doença autoimune sejam conflitantes, parece que alguns destes fenômenos possam estar relacionados à imunização (SHOENFELD; AARON-MAOR, 2000).

2.3 Vacinação em cães

Segundo Diniz e Ferreira (2010), existem três grandes grupos (ou gerações) vacinais em razão das estratégias ou dos conceitos utilizados na preparação do princípio ativo, os antígenos vacinais. A maioria das vacinas infecciosas usadas em cães contém organismos que são atenuados para reduzir a virulência (isto é, "vírus vivo modificado" ou vacinas atenuadas). Nestes casos, os organismos estão intactos, são viáveis e induzem imunidade causando um baixo nível de infecção ao se replicar dentro do animal (DAY et al., 2016). Algumas vacinas utilizam o DNA do agente infeccioso em sua composição, as quais não apresentam risco de voltar a existir a cepa virulenta, como ocorre ocasionalmente com as vacinas vivas atenuadas (NELSON; COUTO, 2015).

O *Vaccination Guidelines Group* (VGG) divide as vacinas em três grupos: essenciais, não essenciais ou opcionais e não recomendadas. As recomendadas (essenciais), que fornecem proteção contra doenças infecciosas, como o vírus da cinomose canina (CDV), o adenovírus canino (CAV; tipos 1 e 2) e o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), sendo de forma global preconizado que todos os cães a recebam. Entretanto, alguns países, podem identificar outras vacinas adicionais e as considerarem como essenciais, cujo exemplo é a vacina antirrábica. As opcionais (não essenciais) apresentam uso determinado com base nos riscos da exposição ou do estilo de vida do indivíduo e com base em uma avaliação da relação risco-benefício. Já as não recomendadas são aquelas para as quais há pouca justificativa científica para seu uso (DAY et al., 2016).

De acordo com mais atual guia de vacinação canina da *American Animal Hospital Association* (“AAHA 2017 *Canine Vaccine Guidelines*”), após completada a fase inicial de vacinação (cães de 6 a 16 semanas de idade) - que consiste na administração de 3 a 6 doses da vacina polivalente (cinomose, parvovirose, hepatite infecciosa e parainfluenza) e 1 dose da vacina antirrábica (12 semanas de idade), e da primeira revacinação que deve ocorrer após 1 ano da última dose da fase inicial, as revacinações subsequentes devem ocorrer no período de 3 anos ou mais, considerando-se os resultados sorológicos para cada doença. Neste mesmo consenso, destaca-se a necessidade de avaliação caso a caso, especialmente no que se diz respeito ao uso de vacinas opcionais, como é o caso da vacina para a traqueobronquite infecciosa canina (FORD et al., 2017).

Diferentemente do preconizado nos países norte-americanos (FORD et al., 2017) e do recomendado pela *World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Guidelines for the Vaccination of Dogs and Cats* a recomendação geral no Brasil é que todos os cães devem ser revacinados anualmente, tanto com vacina polivalente essencial, quanto antirrábica (recomendada por lei), após a fase de vacinação inicial, acrescidas muitas vezes de vacinas opcionais – independente do risco de exposição do animal às referidas doenças e sem a realização de monitoração sorológica (DAY et al., 2016).

Adicionalmente, a premissa de que “vacinas obrigatórias, recomendadas e opcionais devem ser administradas com frequência não superior a realmente necessária” ressaltada pela WSAVA (DAY et al., 2016) também tem sido muito infringida em nosso país. Tais medidas têm sido alvo de muita discussão no meio acadêmico-científico, uma vez que, embora os dados correspondentes à relação entre vacinação e doença autoimune sejam conflitantes, alguns autores defendem a ideia de que alguns destes fenômenos estão claramente relacionados à imunização e merecem ser investigados (SHOENFELD; AARON-MAOR, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo prospectivo foi aprovado pelo comitê de ética e experimentação animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo nº 048/18). Um total de 100 cadelas, oriundas do ao Setor de Clínica Médica de Pequenos Animais e Serviço de Endocrinologia do HV-UFU, Campus Umuarama e Clínicas Veterinárias particulares da região de Uberlândia, MG, foram pré-selecionadas, aleatoriamente, para composição dos grupos experimentais após esclarecimento e livre consentimento de seus tutores, entre os meses de julho de 2018 e abril de 2019.

O grupo de cães diabéticos foi composto por 20 cadelas portadoras de diabetes mellitus insulino dependente (DMID), de qualquer idade e peso. O tamanho da amostra de animais diabéticos foi estabelecido com base no número médio de atendimentos de caninos no HV-UFU nos últimos 5 anos, e foi calculada levando em consideração a incidência de 1:500-1:100 de cães portadores de diabetes mellitus na população geral (0,2-1,0%) (NELSON, 2000), erro amostral de 5% com nível de confiança de 95% (cálculo para amostras simples sobre variáveis categóricas). O grupo controle constitui-se de 80 fêmeas caninas, com idade igual ou superior a 4 anos e peso inferior a 15 kg (pequeno porte), seguindo os assinalamentos da doença descritos por Nelson e Couto (2015), para integralização do total de 100 parcelas experimentais.

Raça, idade (meses), peso (kg), escore corporal (1-9), tipo de alimentação (exclusivamente ração ou mista), estado reprodutivo (castrada ou inteira), idade da castração [juvenil (até 1 ano de idade) ou adulta (> 1 ano de idade)], medicações de uso contínuo, doenças concomitantes, bem como o valor da glicemia em jejum (mg/dL) obtida por glicosímetro digital (Accu Check Performa – Roche) foram registrados tanto para caracterização dos grupos estudados, quanto para análise comparativa entre os grupos, quando pertinente.

No tocante às informações sobre o estado vacinal dos animais, os tutores foram questionados sobre quais tipos e a quantidade de vacinas foram administradas em seus animais, as quais foram classificadas seguindo as recomendações da *Vaccination Guidelines Group* (VGG) para o Brasil em Vacinas Recomendadas - Antirrábica (AR) e Polivalentes (PV), e Vacinas Opcionais - contra Giardíase (VG) e/ou contra Tosse dos Canis/Traqueobronquite Infecciosa Canina (TC).

A frequência da administração das vacinas também foi observada, tanto para as Vacinas Recomendadas (AR e PV), quanto para as Vacinas Opcionais (VG e TC),

gerando os seguintes subgrupos para cada uma delas: A= animais não vacinados, B= animais vacinados apenas quando filhotes (3-6 doses); C= animais vacinados quando filhotes e anualmente; D= animais vacinados quando adultos e anualmente (que não receberam as doses de filhote) e E= animais vacinados de maneira irregular (que não seguiram nenhum dos esquemas vacinais recomendados pela AAHA “*Canine Vaccine Guidelines*” – Ford et al., 2017).

Análise Estatística

Foram analisados dados obtidos das 100 cadelas selecionadas de acordo com os assinalamentos do diabetes mellitus e portadoras da doença (80 cadelas controles e 20 cadelas diabéticas, respectivamente). Estatísticas descritivas [média \pm desvio padrão (valor mínimo- máximo) para as variáveis paramétricas e mediana (valor mínimo- máximo) para as variáveis não paramétricas] e distribuições de frequência e percentagens foram geradas para todas as variáveis.

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de D’Agostino & Pearson e posteriormente analisados pelos testes de *t* student ou Mann-Whitney quando paramétricos e não paramétricos, respectivamente. Na análise inferencial foi feito o teste de qui-quadrado de independência com a finalidade de verificar a existência de relação entre o diabetes mellitus e as demais variáveis estudadas. Neste procedimento, quando ocorreu relação significativa, obteve-se também o coeficiente de contingência que mediu o grau de relação entre as variáveis.

Também foi realizada a análise de regressão logística múltipla utilizando o procedimento de inclusão de variáveis passo-a-passo (*stepwise*), com a finalidade de se obter um modelo estatístico para descrição da probabilidade da ocorrência de diabetes mellitus em função das demais variáveis. Neste procedimento também foram determinadas as razões de chance (*Odds ratio*).

O modelo logístico geral utilizado pode ser descrito por:

$$\text{logit}(\pi) = a + b_i X_i ,$$

sendo: $\text{logit}(\pi)$ a variável dependente associada ao fato de se ter diabetes (1) ou não se ter diabetes (0); *a* o termo constante da equação; b_i o coeficiente de regressão associado às variáveis independentes X_i .

Para a obtenção das probabilidades (P) de ocorrência de diabetes mellitus (1) em função das variáveis independentes (X_i), obtidas no modelo de regressão logística, utilizou-se a seguinte equação:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(a+b_i X_i)}}$$

Sendo: P a probabilidade de ocorrência da diabetes; $[a + b_i X_i]$ a equação de regressão logística obtida em função das variáveis independentes.

Os dados gerados nestas análises estatísticas deram origem a curva ROC (Receiver Operating Characteristic), que representa a relação entre sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico quantitativo, ao longo de um contínuo de valores de "cutoff point". A área sob a curva (AUC) é uma medida eficaz e combinada de sensibilidade e especificidade para avaliar a validade inerente de um teste diagnóstico, seu valor máximo é 1 (AUC máxima = 1) e, isso significa que o teste diagnóstico é perfeito em diferenciar indivíduos doentes de não doentes. Isso implica tanto sensibilidade e especificidade são 1 e ambos os erros - falso positivo e falso negativo - são 0 (KUMAR; INDRAYAN, 2011).

As análises estatísticas foram feitas nos programas GraphPad Prisma 6 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA) e SPSS (IBM, 2011), sendo adotada a significância de 5% para todos os testes. Os procedimentos da análise de regressão logística e teste de qui-quadrado utilizados estão descritos em Arango (2001) e Ayres et al. (2007).

4 RESULTADOS

O grupo diabético, constituiu-se de 20 cadelas portadoras de diabetes mellitus insulino dependente, com idade média de 132 (60-180) meses [equivalente a aproximadamente 11 (5-15) anos] e $8,3 \pm 2,6$ (3,5-13,3) kg, representados pelas raças Pug (n=2, 10%), Shih Tzu (n=2, 10%), Schnauzer miniatura (n=2, 10%), Maltês (n=2, 10%), Teckel (n=1, 5%), Poodle (n=1, 5%), Pinscher (n=1, 5%), Lhasa Apso (n=1, 5%), Cocker Spaniel Inglês (n=1, 5%) e por 35% de cães sem raça definida (n=7).

Os animais do grupo controle, constituído de 80 cadelas pré-selecionadas de acordo com os assinalamentos da doença, apresentaram idade média de 84 (48-168) meses [equivalente a aproximadamente 7 (4-14) anos], $7,9 \pm 3,2$ (1,5-14,9) kg, e foram representadas por 63,7% (n=51) cães sem raça definida, 11,2% (n=9) de cães da raça Shih Tzu, 6,2% (n=5) Poodle, 5% (n=4) Teckel, 3,7% (n=3) Yorkshire, 3,7% (n=3) Lhasa Apso, 2,5% (n=2) Pinscher, 2,5% (n=2) Beagle e 1,2% (n=1) Schnauzer.

Todas as cadelas do grupo controle tiveram valores de glicemia dentro do intervalo de normalidade para a espécie [$75,2 \pm 8,6$ (62-97) mg/dL; VR: 60-100 mg/dL] e significativamente inferiores aos valores hiperglicêmicos apresentados pelas cadelas diabéticas [$252,7 \pm 103$ (102-512) mg/dL] ($p < 0,0001$). Embora tenha-se verificado que as cadelas diabéticas eram mais velhas que as do grupo controle ($p < 0,0001$), todas elas se enquadraram dentro da faixa etária de risco para a doença (4 a 14 anos, conforme critérios de seleção). Não foi verificada diferença entre os pesos dos grupos estudados ($p = 0,6360$), o qual também se manteve dentro do preconizado para cães de pequeno porte.

Das 80 cadelas do grupo controle 47,5% (n=38) eram castradas e 52,5% (n=42) eram inteiras. Considerando as fêmeas castradas, apenas 28,9% (n=11) foram castradas antes dos 12 meses de idade (juvenis) e 71% (n=27) foram castradas após 1 ano de idade (adultas). No grupo diabético, 85% (n=17) eram castradas, sendo 23,5% (n=4) antes dos 12 meses (juvenis) e 76,4% (n=13) após 1 ano de idade.

A alimentação dos animais também foi analisada. Foi observado que metade (50%, n=40) das cadelas do grupo controle alimentavam-se de dieta mista e a outra metade exclusivamente de ração comercial (marcas variadas), enquanto a maioria das cadelas diabéticas alimentava-se exclusivamente de ração (75%, n=15).

A maioria expressiva das cadelas do grupo controle (92,5%, n=74) eram saudáveis, e apenas 7,5% (n=6) apresentavam doenças pré-diagnosticadas, tais

como hepatopatias (n=2), hemoparasitose (n=1), dermatite atópica (n=2) e um animal suspeito para cinomose. Do grupo de diabéticas, 50% (n=10) não apresentavam doenças concomitantes. Dentre as demais, 30% (n=6) eram também portadoras ou suspeitas de terem hiperadrenocorticismos, sendo as demais portadoras de uma ou mais das seguintes desordens: neoplasia de mama, esteatose hepática, endocardiose e pneumonia bacteriana. Todas as diabéticas encontravam-se em insulino-terapia. Doze delas (60%) estavam recebendo exclusivamente insulina como modalidade terapêutica, estando as demais (40%, n=8) recebendo outros medicamentos relacionados com as comorbidades, tais como trilostano (n=4), enalapril (n=1), benzafibrato (n=1), colírio oftálmico a base de anti-inflamatório não esteroide (n=1) e medicação auxiliar no metabolismo de gorduras e proteínas (Hepvet[®]) associada ao SAME (n=1). Uma única cadela do grupo controle estava recebendo algum tipo de medicação de uso contínuo, sendo esta o maleato de oclacitinib (Apoquel[®]) para dermatite atópica.

Quanto a vacinação, verificou-se que as cadelas diabéticas receberam significativamente maior número de doses de vacina ao longo da vida do que as cadelas do grupo controle ($p < 0,0001$). Tal diferença pode ser atribuída às vacinas recomendadas, uma vez que embora não tenha sido observada diferença significativa nas quantidades de doses de vacinas opcionais recebidas entre os grupos, constatou-se que as diabéticas receberam mais doses individuais das vacinas antirrábica e polivalente ($p = 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente) que as cadelas do grupo controle.

Os esquemas de vacinação e as frequências das administrações das vacinas não se apresentam diferentes entre os grupos ($p > 0,05$). Os dados referentes às informações relacionadas à vacinação dos animais estudados encontram-se na Tabela (1).

Tabela 1. Quantidade de doses totais recebidas e frequência de administração vacinal das cadelas diabéticas e do grupo controle.

		Grupo Controle	Grupo Diabético	P
VACINADOS		97,5 % (n=78)	95 % (n=19)	> 0,05
Vacinas Recomendadas	Antirrábica	97,5 % (n=78)	95 % (n=19)	> 0,05
	Polivalente	86,2 % (n=69)	95 % (n=19)	> 0,05
Vacinas Opcionais	Giárdia	7,5% (n=6)	5 % (n=1)	> 0,05
	Tosse dos Canis	10 % (n=8)	20 % (n=4)	> 0,05
QUANTIDADE DE DOSES				
Vacinas Recomendadas	Antirrábica	5,7±3,2 (0-14)	9,2±4,2 (0-15)	0,0001
	Polivalente	6 (0-15)	12 (0-18)	<0,0001
Vacinas Opcionais	Giárdia	0 (0-3)	0 (0-7)	>0,9999
	Tosse dos Canis	0 (0-8)	0 (0-15)	0,1289
Quantidade total de doses		12,9±7,1 (0-32)	21,9±11 (0-47)	<0,0001
FREQUÊNCIA DE ADMINISTRAÇÃO				
Vacinas Recomendadas	Antirrábica	A= 0 (n=0)	A= 5% (n=1)	
		B= 1,25% (n=1)	B= 0 (n=0)	
		C= 56,2% (n=45)	C= 65% (n=13)	
	Polivalente	D= 23,7% (n=19)	D= 30% (n=6)	
		E= 16,2% (n=13)	E= 0 (n=0)	
		A= 13,75% (n=11)	A= 5% (n=1)	
Vacinas Opcionais	Giárdia	B= 1,25% (1)	B= 0 (n=0)	
		C= 42,5% (n=34)	C= 55% (n=11)	
		D= 16,25% (n=13)	D= 30% (n=6)	
	Tosse dos Canis	E= 26,25% (n=21)	E= 10% (n=2)	
		A= 92,5% (n=74)	A= 95% (n=19)	
		B= 1 (n=1,25%)	B= 0 (n=0)	
	Giárdia	C= 0 (n=0)	C= 0 (n=0)	
		D= 0 (n=0)	D= 0 (n=0)	
		E= 6,25% (n=5)	E= 5% (n=1)	
	Tosse dos Canis	A= 90% (n=72)	A= 85% (n=17)	
		B= 1,25% (n=1)	B= 0 (n=0)	
		C= 1,25% (n=1)	C= 5% (n=1)	
		D= 2,5% (n=2)	D= 5% (n=1)	
		E= 5% (n=4)	E= 5% (n=1)	

Legenda: A= animais não vacinados, B=animais vacinados apenas quando filhotes; C=animais vacinados quando filhotes e anualmente; D= animais vacinados quando adultos e anualmente (que não receberam as doses de filhote) e E=animais vacinados de maneira irregular (que não seguiram nenhum dos esquemas vacinais recomendados pela AAHA 2017 "Canine Vaccine Guidelines").

Dentre as variáveis nominais analisadas por este estudo, observou-se que idade (CC=0,388; $p < 0,0001$), tipo de alimentação (CC=0,197; $p = 0,044$) e estado reprodutivo (CC=0,289; $p = 0,003$) apresentaram relação com o desenvolvimento de DM. Assim, isoladamente, verificou-se que fêmeas com idade entre 4 e 10 anos, que

recebem alimentação mista (composta de ração e alimentos caseiros variados) e sejam inteiras tiveram alta incidência de DM com 2,12; 2 e 3,5 vezes mais risco de apresentar DM, respectivamente, que a população em geral.

Considerando todas as variáveis preditoras disponíveis (nominais e numéricas), a probabilidade do desenvolvimento de DM foi estimada para todas as cadelas do estudo utilizando modelos de regressão logística (Tabelas 2 e 3).

O modelo 1 incluiu estado reprodutivo (fêmea inteira), ocorrência vacinação (animal vacinado) e quantidade total de doses de vacina recebidas (Tabela 2).

Tabela 2. Modelo inicialmente gerado a partir da análise de regressão logística para discriminação de cadelas com diabetes mellitus e controles.

Modelo	Variável	Coefficiente	95% CI	Odds	P
1	Fêmea Inteira	-1,683	0,044 a 0,782	0,186	0,0218
	Vacinada	-3.304	0,002 a 0,776	0,037	0,0337
	Total Doses de Vacina	0,155	1,072 a 1,270	1,167	0,0003
	Constante	-0,253		0,776	<0,0001

Modelo desenvolvido utilizando os dados nominais e numéricos de 100 cadelas (20 diabéticas e 80 controles) colhidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU) e Centros Especializados de Endocrinologia Veterinária Particulares entre julho de 2018 e abril de 2019.

Utilizando os critérios identificados pelo modelo 1, tem-se que cada dose adicional de vacina em fêmeas inteiras e vacinadas, aumenta em 16,7% as chances de desenvolvimento de diabetes mellitus insulino dependente. Salienta-se ainda por este modelo, que a influência do número total de doses recebidas para a ocorrência da doença é um fator independente da idade do animal.

À análise da curva ROC, a AUC da variável quantidade total de doses de vacinas recebidas foi de 77,5 (95% CI, 0,6494 a 0,9006). Considerando que quanto maior a AUC (mais próxima de 100), melhor o desempenho do teste para segregar corretamente doentes de animais saudáveis, considera-se que o número total de doses de vacina seja realmente um fator relevante a ser considerado para o desenvolvimento de DM.

A sensibilidade e a especificidade de várias doses de vacina para detectar diabetes mellitus como dados hipotéticos foram gerados, a melhor combinação foi obtida um *cut-off* de 17 doses de vacina (Sen75%; Esp75%). Tal resultado significa que 75% das cadelas portadoras de diabetes mellitus receberam mais de 17 doses de vacina, enquanto apenas 25% delas receberam menor quantidade de doses. Por

outra perspectiva, nota-se que 75% das cadelas não diabéticas receberam menos de 17 doses de vacina durante toda a vida.

Após este resultado, uma nova análise de regressão logística foi realizada substituindo a variável numérica “quantidade total de doses de vacina” pelo *cut-off* de 17 doses recebidas, o qual deu origem ao modelo 2 (Tabela 3).

Tabela 3. Modelo desenvolvido a partir da análise de regressão logística para discriminação de cadelas com diabetes mellitus e controles considerando o *cut-off* de 17 doses de vacina.

Modelo	Variável	Coefficiente	95% CI	Odds	P
2	Idade entre 4 e 10 anos	-1,979	0,035 a 0,541	0,138	0,005
	Alimentação mista	-1,531	0,049 a 0,949	0,216	0,042
	Fêmea Inteira	-1,940	0,030 a 0,693	0,144	0,016
	<i>Cut-off</i> 17doses de vacina	1,439	1,149 a 15,477	4,217	0,030
	<i>Constante</i>	0,198		1,219	<0,0001

Modelo desenvolvido utilizando os dados nominais de 100 cadelas (20 diabéticas e 80 controles) colhidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFG) e Centros Especializados de Endocrinologia Veterinária Particulares entre julho de 2018 e abril de 2019.

Analisando este segundo modelo observou-se que fêmeas inteiras, com idade entre 4 a 10 anos, que são alimentadas com ração e alimentos caseiros (dieta mista) e que receberam mais de 17 doses de vacina apresentaram 4,2 vezes mais chance de ter DM que a população em geral. Quando testado, o modelo 2 foi capaz de identificar 75% dos animais tanto com diabetes, quanto saudáveis ($p=0,00004$) sendo, portanto, um modelo relevante a ser considerado.

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve como principal objetivo verificar se a vacinação poderia ser um fator importante a ser considerado no desenvolvimento de diabetes mellitus insulino dependente em cães. Os resultados obtidos apontam para o fato de que esta doença endócrina, que tem a possibilidade de envolvimento autoimune em sua origem na espécie canina, pode estar, dentre outros fatores, associada a exposição dos animais às vacinas comumente utilizadas na rotina.

Na medicina humana muitos estudos são realizados na tentativa de associar diversas vacinas ao DM insulino dependente. DeStefano et al. (2001) realizou um estudo caso-controle considerando com a intenção de avaliar associações entre vacinações infantis, particularmente contra hepatite B e *Haemophilus influenzae* tipo b, e o risco de desenvolvimento do DM insulino dependente. Embora os resultados deste estudo e as evidências epidemiológicas não tenham sido suficientes para sustentar tal associação, outro estudo que testou as supracitadas vacinas humanas em animais, demonstrou que o tempo e o conteúdo destas podem levar ao desenvolvimento do diabetes mellitus. A imunização com vacina contra hepatite B após 2 meses de vida foi associado com um risco aumentado de DMID, assim como a vacina contra BCG, com a qual os animais apresentaram quase o dobro do risco de desenvolvimento do DM quando a imunização ocorreu após 5 anos de idade (CLASSEN; CLASSEN, 1997).

Em outro estudo que suplanta a relação entre vacinação e o DM insulino dependente em seres humanos recém-diagnosticados, no qual foram feitas biópsia das ilhotas pancreáticas, observou-se infiltrado inflamatório composto por células T CD4, T CD8, células B e macrófagos, sugerindo tanto que estas células podem apresentar importante papel na destruição das células beta (IMAGAWA et al., 1999), quanto que tal efeito possa ter sido originado da vacinação, já que esta inocula antígenos no organismo com objetivo de gerar imunidade por meio de células T e células B (BEREK; ZIEGNER, 1993).

Reforça-se que os assinalamentos do DM ditaram a seleção das cadelas do grupo controle, ou seja, que todas as fêmeas que compuseram este estudo, de uma certa forma, apresentavam predisposição, de acordo com a literatura, à doença estudada (BORIN-CRIVELLENTI, 2015; NELSON, COUTO, 2015; PÖPPL, GONZALÉZ, 2005). Ademais, foram coletadas informações relacionadas a fatores

sabidamente causadores de resistência insulínica, tais como estado reprodutivo e hábitos alimentares.

Corroborando a literatura, os modelos aqui propostos destacaram que fêmeas inteiras (modelo 1 e 2) e fêmeas alimentadas com dietas mistas (modelo 2) devem ser levados em consideração para o desenvolvimento da doença em cães.

O primeiro relaciona-se primordialmente à ação da progesterona como hormônio contrarregulatório da insulina, este hormônio alcança níveis plasmáticos mais altos durante o diestro do ciclo estral da cadela, que é determinado por 4 fases (proestro, estro, diestro e anestro). Considerando fêmeas inteiras, a ocorrência de cio se dá a cada 6 meses, e este leva a um conseqüente aumento dos níveis de progesterona (EIGENMANN, 1983). Estudos já foram realizados na tentativa de comprovar a relação entre o estado reprodutivo das fêmeas e o desenvolvimento da doença, em um destes estudos, nove das 13 pacientes fêmeas (69,2%), haviam entrado no cio até dois meses antes do diagnóstico de DM (PÖPPL; GONZÁLEZ, 2005). Selman et al. (1994) ainda realizou um outro estudo, com uso de progesterona; neste, observou-se que o tratamento prolongado com este hormônio resultou em intolerância à glicose, sem um aumento nos níveis de insulina, levando a destruição das células beta pancreáticas.

Em relação ao tipo de alimentação, Pöpl e González (2005) relacionaram a alimentação caseira com o desenvolvimento de DM, demonstrando que 78% dos cães recebiam comida caseira, o que de acordo com Guptill et al., (2003), são geralmente ricas em gorduras. Estes mesmos autores também enfatizaram, assim como o observado no presente estudo, que a alimentação mista, composta tanto de ração quanto de comida caseira, apresenta-se como fator relevante ao desenvolvimento da doença.

Algumas limitações deste estudo podem ser elencadas. Embora se tenha definido estatisticamente o número de cadelas diabéticas, este limita-se à casuística local. Como levou-se em consideração os assinalamentos da diabetes mellitus na espécie canina como um dos critérios de inclusão, somente fêmeas caninas foram incluídas, limitando a extrapolação dos resultados aqui obtidos para machos e a outras espécies. Dito isto, estudos futuros são necessários para se testar os modelos desenvolvidos em um número mais expressivo de animais e/ou eventualmente detectar outros fatores envolvidos no desenvolvimento do DM.

6 CONCLUSÃO

Os resultados aqui obtidos permitem concluir que além dos já conhecidos fatores relacionados à resistência insulínica (dietas mistas, fêmeas inteiras e com idade superior a 4 anos) a quantidade total de doses vacinais recebidas pelas cadelas apresentou significativa associação com o desenvolvimento do diabetes mellitus insulínico dependente (DMID), merecendo atenção e futuras investigações à respeito da possibilidade de os atuais protocolos vacinais estarem relacionados ao desenvolvimento de autoimunidade em cães.

REFERÊNCIAS

AHLGREN, K. M., FALL, T., LANDEGREN, N., GRIMELIUS, L., VON EULER, H., SUNDBERG, K., HANSSON-HAMLIN, H. Lack of evidence for a role of islet autoimmunity in the aetiology of canine diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105473, 2014.

ALEJANDRO, R., FELDMAN, E. C., SHIENVOLD, F. L., MINTZ, D. H. Advances in canine diabetes mellitus research: etiopathology and results of islet transplantation. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 9, p. 1050-1055, 1988.

ARANGO, H. G. Bioestatística: Teórica e Computacional. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2001.

AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. dos. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: **Sociedade Civil Mamirauá**; Brasília: CNPq, 364 p, 2007.

BEREK, C.; ZIEGNER, M. The maturation of the immune response. **Immunology today**, v. 14, n. 8, p. 400-404, 1993.

BODANSKY, H. J., DEAN, B. M., GRANT, P. J., MCNALLY, J., SCHWEIGER, M. S., HAMBLING, M. H., WALES, J. K. Does exposure to rubella virus generate endocrine autoimmunity?. **Diabetic Medicine**, v. 7, n. 7, p. 611-614, 1990.

BORIN-CRIVELLENTI, S. Endocrinologia. In: CRIVELLENTI, L.Z.; BORIN-CRIVELLENTI, S. **Casos de Rotina em Medicina Veterinária de Pequenos Animais**. 2. ed. MedVet: São Paulo, 2015.

CLASSEN, D. C., CLASSEN, J. B. THE TIMING OF PEDIATRIC IN NZAjo), AN). **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 6, n. 7, p. 449-454, 1997.

CLASSEN, J. B.; CLASSEN, D. C. Vaccines and the risk of insulin-dependent diabetes (IDDM): potential mechanism of action. **Medical hypotheses**, v. 57, n. 5, p. 532-538, 2001.

COPPIETERS, K. T., VON HERRATH, M. G. Histopathology of type 1 diabetes: old paradigms and new insights. **The review of diabetic studies: RDS**, v. 6, n. 2, p. 85, 2009.

DAVISON, L. J., WALDING, B., HERRTAGE, M. E., CATCHPOLE, B. Anti-insulin antibodies in diabetic dogs before and after treatment with different insulin preparations. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 22, n. 6, p. 1317-1325, 2008. (a)

DAVISON, L. J., WEENINK, S. M., CHRISTIE, M.R., HERRTAGE, M. E. Autoantibodies to GAD65 and IA-2 in canine diabetes mellitus. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 126, n. 1-2, p. 83-90, 2008. (b)

DAVISON, L. J., HERRTAGE, M. E., CATCHPOLE, B. Autoantibodies to recombinant canine proinsulin in canine diabetic patients. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 1, p. 58-63, 2011.

DAY, M. J., HORZINEK, M. C., SCHULTZ, R. D., SQUIRES, R. A. Diretrizes Para a Vacinação De Cães E Gatos. **Journal of small animal practice**, v. 57, p. 699-706, 2016.

DE FARIA, P. F. Diabetes mellitus em cães. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 08-22, 2007.

DESTEFANO, F., MULLOOLY, J. P., OKORO, C. A., CHEN, R. T., MARCY, S. M., WARD, J. I., ... & BOHLKE, K. Childhood vaccinations, vaccination timing, and risk of type 1 diabetes mellitus. **Pediatrics**, 108(6), E112, 2001.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. **New England journal of medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DHEIN, C. R.; GORHAM, J. R. Host response to vaccination. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 16, n. 6, p. 1227-1245, 1986.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 19-30, 2010.

DUVAL, D.; GIGER, U. Vaccine-associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 5, p. 290-295, 1996.

EIGENMANN, J. E., EIGENMANN, R. Y., RIJNBERK, A., VAN DER GAAG, I., ZAPF, J., FROESCH, E. R. Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. **European Journal of Endocrinology**, v. 104, n. 2, p. 167-176, 1983.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Elsevier Health Sciences, 2004.

FOLEY, J. E., ORGAD, U., HIRSH, D. C., POLAND, A., PEDERSEN, N. C. Outbreak of fatal salmonellosis in cats following use of a high-titer modified-live panleukopenia virus vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 1, p. 67-70, 43-4, 1999.

FORD, R.B., LARSON, L.J., SCHULTZ, R.D., WELBOR, L.V. 2017 AAHA Canine Vaccination Guidelines. **Trends Magazine**, 2017.

GEPTS, W., TOUSSAINT, D. Spontaneous diabetes in dogs and cats. **Diabetologia**, v. 3, n. 2, p. 249-265, 1967.

GILOR, C., NIESSEN, S. J. M., FURROW, E., DIBARTOLA, S. P. What's in a name? Classification of diabetes mellitus in veterinary medicine and why it matters. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 30, n. 4, p. 927-940, 2016.

GUPTILL, L.; GLICKMAN, L.; GLICKMAN, N. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records (1970–1999). **The Veterinary Journal**, v. 165, n. 3, p. 240-247, 2003.

HAINES, D. M. A re-examination of islet cell cytoplasmic antibodies in diabetic dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 11, n. 3, p. 225-233, 1986.

HOENIG, M., DAWE, D. L. A qualitative assay for beta cell antibodies. Preliminary results in dogs with diabetes mellitus. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 32, n. 3-4, p. 195-203, 1992.

HUSSAIN, M. J., MAHER J., WARNOCK T., VATS A., PEAKMAN M., VERGANI D. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM. **Diabetologia**, v. 41, n. 3, p. 343-349, 1998.

IMAGAWA, A., HANAFUSA, T., ITOH, N., WAGURI, M., YAMAMOTO, K., MIYAGAWA, J., ... & TSUJI, T. Immunological abnormalities in islets at diagnosis paralleled further deterioration of glycaemic control in patients with recent-onset type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, 42(5), 574-578, 1999

KEHRLI, M. E., BURTON, J.L., NONNECKE, B.J., LEE, E.K. Effects of stress on leukocyte trafficking and immune responses: implications for vaccination. **Advances in veterinary medicine**, v. 41, p. 61-81, 1998.

KOHN, B., GARNER, M., LUBKE, S., BENNETT, D., BRUNNBERG, L. Polyarthritis following vaccination in four dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 16, n. 01, p. 06-10, 2003.

KOLB-BACHOFEN, V.; KOLB, H. A role for macrophages in the pathogenesis of type 1 diabetes. **Autoimmunity**, v. 3, n. 2, p. 145-155, 1989.

KUMAR, R.; INDRAYAN, A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. **Indian pediatrics**, v. 48, n. 4, p. 277-287, 2011.

LING, G. V., LOWENSTINE, L. J., PULLEY, L. T., KANEKO, J. J. Diabetes mellitus in dogs: a review of initial evaluation, immediate and long-term management, and outcome. **Journal-American Veterinary Medical Association (USA)**, 1977.

MCANULTY, J. F.; RUDD, R. G. Thrombocytopenia associated with vaccination of a dog with a modified-live paramyxovirus vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 11, p. 1217-1219, 1985.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR, C. Innate immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

NELSON, R. W., COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1400p

NELSON, R. W. Distúrbios do pâncreas endócrino. In: ETTINGER, S.J. (ed). **Tratado de medicina interna veterinária**, 3.ed. São Paulo, 1992. p.1752-1798.

NELSON, W. N. Diabetes Mellitus. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING; R.G. **Saunders manual of small animal practice**. 18.ed. USA: Saunders Company, 1994. p249-256.
NELSON, R. W. Diabetes mellitus. In: ETTINGER S.J., FELDMAN E.C., Eds. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 2000. 5th ed. Vol. 2. Philadelphia: WB Saunders, p.1438–1460.

PÖPPL, A. G., GONZALÉZ, F. H. D. Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, 2005.

ROTH, J. A. The principles of vaccination: the factors behind vaccine efficacy and failure. **Veterinary medicine (USA)**, 1991.

SANDERS, M. E.; MAKGOBA, M. W.; SHAW, Stephen. Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. **Immunology today**, v. 9, n. 7-8, p. 195-199, 1988.

SCHATTNER, A. Consequence or coincidence?: The occurrence, pathogenesis and significance of autoimmune manifestations after viral vaccines. **Vaccine**, v. 23, n. 30, p. 3876-3886, 2005.

SELMAN, P. J.; RUTTEMAN, G. R.; RIJNBERK, A. Progestin treatment in the dog I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. **European Journal of Endocrinology**, v. 131, n. 4, p. 413-421, 1994.

SHOENFELD, Y., ARON-MAOR, A. Vaccination and autoimmunity— ‘vaccinosis’: a dangerous liaison? **Journal of autoimmunity**, v. 14, n. 1, p. 110, 2000

SPSS, I. I. B. M. et al. IBM SPSS statistics for Windows, version 20.0. **New York: IBM Corp**, v. 440, 2011.

SZELACHOWSKA, M.; KRETOWSKI, A.; KINALSKA, I. Increased in vitro interleukin-12 production by peripheral blood in high-risk IDDM first degree relatives. **Hormone and metabolic research**, v. 29, n. 04, p. 168-171, 1997.

Anexo 1 – Dados obtidos dos prontuários de fêmeas caninas diabéticas e não diabéticas.

Nome do animal: <input type="checkbox"/> diabético <input type="checkbox"/> não diabético		RGHV: Glicemia:
Idade: _____ anos	Peso: ____ kg	Escore corporal (1-9): _____
Raça: _____	Alimentação: <input type="checkbox"/> Ração <input type="checkbox"/> Caseira <input type="checkbox"/> Mista	
Estado Reprodutivo <input type="checkbox"/> inteira <input type="checkbox"/> castrada (idade da castração: _____ anos)		
Medicações de uso contínuo:		
Doenças concomitantes:		
ESTADO VACINAL <input type="checkbox"/> já recebeu vacinas <input type="checkbox"/> não vacinado		
<u>Vacinas polivalentes:</u> <input type="checkbox"/> somente quando filhote <input type="checkbox"/> filhote e anual <input type="checkbox"/> adulto e anual <input type="checkbox"/> irregular		
Quantidade total de doses já recebidas: _____		
Qual a procedência das vacinas utilizadas? <input type="checkbox"/> nacional <input type="checkbox"/> importada <input type="checkbox"/> veterinário <input type="checkbox"/> outro _____		
<u>Vacina antirrábica:</u> <input type="checkbox"/> somente quando filhote <input type="checkbox"/> filhote e anual <input type="checkbox"/> adulto e anual <input type="checkbox"/> irregular		
Quantidade total de doses já recebidas: _____		
Qual a procedência das vacinas utilizadas? <input type="checkbox"/> nacional <input type="checkbox"/> importada <input type="checkbox"/> veterinário <input type="checkbox"/> outro _____		
Vacinas opcionais: Qual(is)? _____		
Qual frequência: _____		
Quantidade total de doses já recebidas: _____		
Observações relevantes:		