

Perfiles metabólicos y endócrinos en perros sanos: influencia de la ingesta y el sexo

Pessina, P.¹; Sosa, C.²; Araújo, M.¹; Orellana, B.³; Brambillasca, S.⁴; Cajarville, C.⁴; Meikle, A.¹

RESUMEN

Se busca determinar el efecto de la ingesta y del sexo sobre las concentraciones séricas de la glucosa, colesterol, ácidos grasos no esterificados (AGNE), proteínas totales, albúmina, insulina, cortisol, tiroxina (T4) y hormona estimulante de la tiroides (TSH) en caninos Cocker Spaniel (4 hembras y 3 machos). El sangrado se realiza cada hora desde 2 horas pre-ingesta hasta 9 horas post-ingesta. La determinación de metabolitos se realiza en suero por espectrofotometría y la hormonal por radioinmunoanálisis. La ingesta provoca una disminución en las concentraciones séricas de los ácidos grasos y aumento de la insulina ($P < 0.0001$ para ambas variables), mientras que no afecta las de colesterol. Dos horas post-ingesta los niveles de albúmina disminuyen. Las concentraciones de T4 aumentan al momento de la ingesta y se mantienen elevadas por 4 horas. Las hembras presentan mayores concentraciones de colesterol (2.4 ± 0.07 vs 1.9 ± 0.08 g/L, $P < 0.05$) y tienden a presentar mayores concentraciones de insulina (11.9 ± 1.6 vs 8.0 ± 1.8 μ UI/ml, $P = 0.12$) y cortisol (2.29 ± 0.11 vs 1.99 ± 0.13 μ g/dL, $P = 0.08$) que los machos. La ingesta y el sexo modifican las concentraciones séricas de algunos de los metabolitos y hormonas estudiadas, demostrándose así la influencia que el momento de sangrado y el género tienen al momento de validar resultados.

Palabras clave: canino, ingesta, sexo, metabolitos, hormonas.

SUMMARY

Food Intake and gender effects on serum levels of glucose, cholesterol, non-sterified fatty acids (NEFA), protein, albumin, insulin, cortisol, thyroxin (T4) and thyroid stimulating hormone (TSH) are investigated in Cocker Spaniel dogs (4 females, 3 males). Blood sampling is performed hourly from 2 hours before to 9 hours after intake. Determination of metabolites and hormones are performed by spectrophotometry and radioimmunoanalysis respectively. Intake affects NEFA and insulin concentrations, while it has no effect on cholesterol. Albumin concentration decreases 2 hs post intake. T4 concentrations increase at intake and remain high for 4 hours. Females present higher cholesterol (2.40 ± 0.07 vs 1.91 ± 0.08 g/L, $P < 0.05$), and tend to present higher insulin (11.9 ± 1.6 vs 8.0 ± 1.8 uUI/ml, $P = 0.12$) and cortisol (2.29 ± 0.11 vs 1.99 ± 0.13 μ g/dL, $P = 0.08$) concentrations than males, respectively. Food intake and sex affect serum concentrations of some metabolites and hormones, demonstrating that they should be taken into account when a sample is taken for diagnosis.

Key words: canine, intake, gender, metabolites, hormones.

INTRODUCCIÓN

Los niveles séricos de glucosa, colesterol, insulina y otros metabolitos dependen entre otros factores, de la composición química de la dieta, del estado físico del animal (estrés) y de la hora del día en que se toma la muestra (Kraft y col., 1994; Nguyen y col., 1998). Los protocolos de extracción para cada metabolito están bien especificados en humanos y si bien existen algunos trabajos en perro, el veterinario frecuentemente extrae la muestra sin considerar algunos aspectos que pueden incidir en el resultado, tales como la hora de toma de muestra o el momento respecto a la ingesta, entre otros factores.

No hemos encontrado trabajos en los cuales se haya realizado una determinación completa de perfiles metabólicos y endócrinos en perros sanos. Algunos estudios presentan únicamente las variaciones de glucosa, colesterol e insulina postprandiales (Kraft y col., 1994; Treiber y col., 2005). Además, en la mayoría de los ensayos, los sangrados se realizan a las 2 y 4 horas post-ingesta, desconociendo las variaciones metabólicas y endócrinas posteriores esperables en caninos como resultado de que éstos ingieren su comida una vez al día. Hoh y col., (2006) observaron que la concentración plasmática de tiroxina (T4) presenta variaciones a lo largo del día, siendo mayor entre las 11:00

y las 14:00 h. No hemos encontrado reportes sobre los efectos de la ingesta en las concentraciones de las hormonas mencionadas anteriormente.

Por otro lado, existen escasos reportes respecto del efecto del sexo sobre la concentración de metabolitos y hormonas. Las concentraciones de colesterol son más altas en hembras que en machos caninos (Kaspar y Norris, 1977; Pessina y col., 2009). Para otras especies (humanos, ruminantes) se encontró un efecto del sexo sobre las concentraciones basales de cortisol (Woods y col., 2003), pero en perros no se ha encontrado un efecto del mismo (Reimers y col., 1990; Pessina y col., 2009). En el mismo sentido, no se

¹Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República Oriental del Uruguay.

²Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.

³Servicio de Diagnóstico, Laboratorio de Diagnóstico, Tegucigalpa, Honduras.

⁴Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República Oriental del Uruguay.

Recibido: 16/7/10 Aprobado: 27/10/10

encontró efecto del sexo sobre las concentraciones de T4 (Reimers y col., 1990).

La importancia de conocer las variaciones fisiológicas de hormonas y metabolitos en relación con la ingesta y el género, radica en poder determinar los rangos fisiológicos que permitan posteriormente evaluar muestras de animales con diferentes patologías. El objetivo de este estudio es determinar si existen variaciones post-prandiales y de género (machos vs hembras) en las concentraciones plasmáticas de metabolitos y hormonas que se utilizan frecuentemente en el diagnóstico de numerosas patologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El estudio se realizó en Unidad Experimental de Nutrición Canina del Departamento de Nutrición de la Facultad de Veterinaria y el protocolo experimental fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República, Uruguay. Se utilizaron siete perros Cocker Spaniel adultos sanos entre 6 y 9 años (3 machos y 4 hembras), con un peso de $11,9 \pm 0,7$ kg (XDS). Los perros se mantuvieron en jaulas individuales y fueron alimentados a las 9:00 am diariamente con 27 g MS/kg^{0.75}/d de un alimento comercial (Excellent, Purina, Nestlé, Bs. As., Argentina; 22 % proteína bruta, 10 % extracto etéreo, 4 % fibra bruta y 8 % cenizas), teniendo libre disponibilidad al agua de bebida. Previo a las determinaciones los animales tuvieron un período de adaptación a la dieta y a las condiciones experimentales de siete días. La extracción de las muestras de sangre se realizó mediante venopunción de la vena safena, de manera seriada cada hora, comenzando 2 horas antes de la ingesta, hasta 9 horas después de la misma. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos y el suero se almacenó a -20 °C hasta la realización de los ensayos. Las concentraciones de glucosa, colesterol, insulina y cortisol fueron determinadas en todas las muestras, mientras que el resto de los metabolitos y hormonas fueron determinadas cada dos horas debido a que el suero no fue suficiente para las restantes determinaciones.

Determinación de metabolitos

Los métodos de análisis y los kits usados para la determinación de metabolitos realizada en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay, fueron: Glucosa mediante el método GOD (glucosa oxidasa) POD (peroxidasa) 4 AF (4-aminofenazona) (Wiener lab, Rosario-Argentina); Colesterol por el método CHOD-PAP (Wiener Lab 861231904, Rosario, Argentina), Proteínas Totales por la Reacción de Biuret (Wiener Lab 864102502); Albúmina por Verde de Bromocresol (Wiener Lab 861250000) y Ácidos grasos no esterificados (AGNE) por el método ACS-ACOD (Wako Chemicals, 994-75409, Los Angeles, USA). Todas las determinaciones se realizaron en un sólo ensayo. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo para los controles Standatrol y A-plus (Wiener Lab) para todos los metabolitos fueron menores a 10 y 12 % respectivamente. Las concentraciones de todos los metabolitos analizados fueron procesadas por espectrofotometría (Photometer, BTS-305, Biosystems).

Determinación hormonal

Las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay. La determinación de insulina en plasma se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida utilizando un kit comercial DPC (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, USA). La sensibilidad del ensayo fue de 1,6 μ UI/mL. Todas las determinaciones se realizaron en un solo ensayo y el CV intraensayo del control (15 μ UI/mL) fue de 5.7%.

Las concentraciones de cortisol se determinaron por un RIA en fase sólida utilizando kits DPC. La sensibilidad del ensayo fue de 0.35 μ g/dL. Los CV intraensayo para controles bajos (1.0 μ g/dL) y medios (5.0 μ g/dL) fueron 3.4 % y 5.3 %, respectivamente.

La T4 se determinó por RIA en fase sólida y la hormona estimulante de la tiroidea (TSH) por un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) utilizando kits comerciales DPC. La sensibilidad del ensayo de T4 fue de 0.36 mg/dL. Los CV intraensayo para T4 fueron de 7.5 % para el control bajo (0.64 mg/dL) y 4.6 % para el

control alto (1.7 mg/dL). La sensibilidad del ensayo de TSH fue de 0.02 ng/mL. Los CV intraensayo para TSH fueron de 10.6 % para el control bajo (0.26 ng/mL) y 8.2 % para el control alto (2.9 ng/mL).

Análisis estadístico

El análisis de medidas repetidas en el tiempo fue utilizado para todas las variables, mediante un procedimiento mixto (PROC MIXED de SAS®: Statical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 2000), que incluyó como efectos fijos sexo y hora de sangrado y la interacción entre ambos. Los datos se presentan como promedios mínimos cuadrados y los errores estándares. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Concentraciones de metabolitos

En la Tabla 1 se resumen los efectos del sexo, hora de muestreo y su interacción sobre las concentraciones de los diferentes metabolitos. Las concentraciones de glucosa fueron afectadas únicamente por la hora de muestreo respecto a la ingesta. A pesar de que las concentraciones de glucosa disminuyeron a las 3 y 5 horas post-ingesta, no se observaron grandes variaciones (Figura 1 A).

Las concentraciones de colesterol estuvieron afectadas por el sexo: las hembras tuvieron mayores concentraciones de colesterol que los machos (2.4 ± 0.07 vs 1.9 ± 0.08 g/L, $P < 0.0001$), pero no se observó efecto de la hora de muestreo (Figura 1 B).

La hora del muestreo de sangre afectó la concentración de AGNE ($P < 0.0001$), pero no hubo efecto del sexo ni de la interacción. Se observó un descenso significativo en la concentración de AGNE desde la hora de ingesta hasta la hora 6 post-ingesta (0.66 vs 0.19 mM, $P < 0.0001$), observándose un aumento significativo a la hora 8 (0.19 vs 0.44 mM, $P < 0.0001$; Figura 1 C).

Las concentraciones de albúmina tendieron a ser afectadas por la hora de muestreo ($P = 0.06$) y no estuvieron afectadas por el sexo ni por la interacción entre sexo*hora (Tabla 1). Las concentraciones de albúmina disminuyeron significativamente después de la ingesta durante el período evaluado ($P < 0.05$; Figura 1 E).

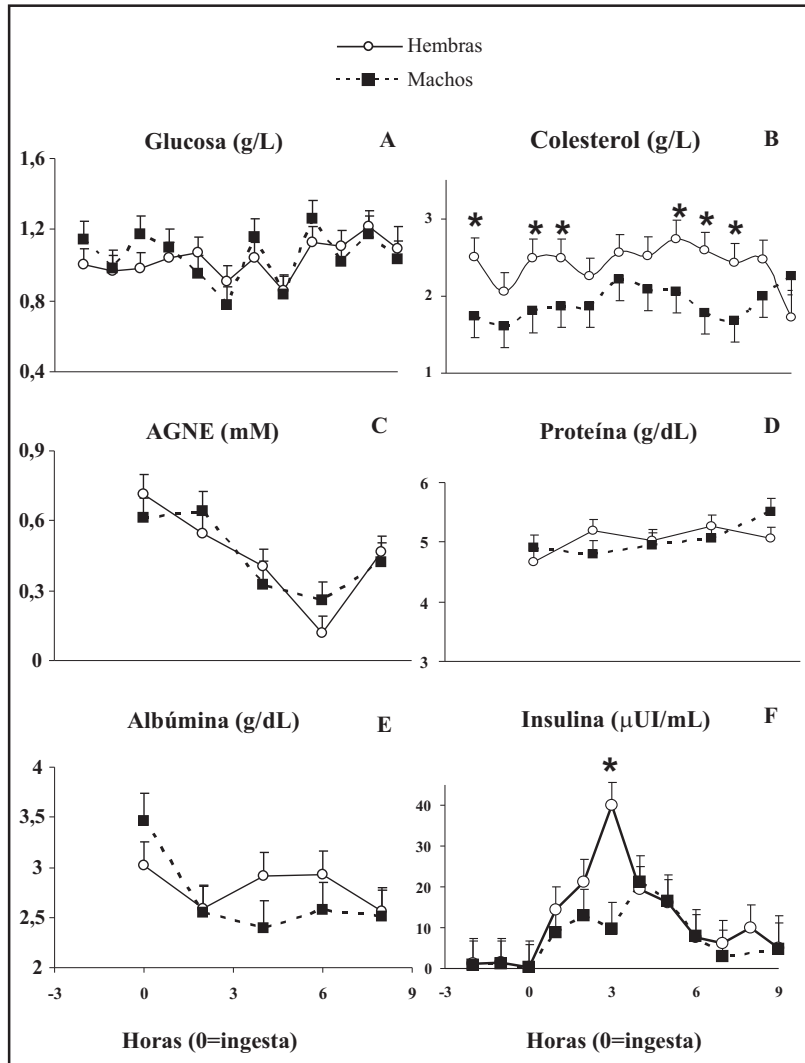


Figura 1. Concentraciones de glucosa (A), colesterol (B), ácidos grasos (AGNE, C), proteínas plasmáticas totales (D), albúmina (E) e insulina (F) en plasma de 7 perros Cocker Spaniel sanos machos y hembras antes y después de la ingesta. Los asteriscos indican diferencias entre género, $P < 0.05$.

Las concentraciones de proteínas totales estuvieron positivamente correlacionadas con las de glucosa ($r=0.37$, $P=0.03$, $n=35$) y con las de insulina ($r=0.40$, $P=0.01$, $n=35$).

Concentraciones hormonales

Las concentraciones plasmáticas de insulina estuvieron afectadas por la hora de muestreo de sangre ($P<0.0001$). Se observó un aumento en las concentraciones de insulina a la hora post-ingesta (0.39 vs 11.6 $\mu\text{UI/ml}$, $P<0.0001$), presentando

el pico máximo 3 horas post-ingesta (24.8 $\mu\text{UI/ml}$, $P<0.0001$). A partir de esta hora los niveles descendieron manteniéndose superiores a los niveles pre-ingesta por 5 horas (Figura 1 F). Las hembras tendieron a presentar mayores niveles de insulina que los machos (11.9 ± 1.6 vs 8.0 ± 1.8 mUI/ml , $P=0.128$), y esta diferencia fue significativa a las 3 horas post-ingesta (40 ± 5.5 vs 9.6 ± 3.4 mUI/ml , $P=0.0007$). Las concentraciones de cortisol estuvieron afectadas por la hora de muestreo (Figura 2 A) y tendieron a ser mayores en

las hembras que en los machos (2.29 ± 0.11 vs 1.99 ± 0.13 $\mu\text{g/dL}$, $P=0.083$). Las hembras presentaron mayores niveles en el momento de la ingesta (hora 0) y una hora después ($P<0.05$). Independientemente del género, los niveles de cortisol aumentaron una hora post-ingesta, pero volvieron a niveles basales a las dos horas post-ingesta (Figura 2 A). Un nuevo aumento se observó a las 4 horas post-ingesta para luego disminuir hacia el final del experimento. Las concentraciones de cortisol estuvieron positivamente correlacionadas con las de colesterol ($r=0.23$, $P<0.05$, $n=79$).

Las concentraciones de T4 fueron afectadas por la hora de muestreo ($P=0.0045$) y no se observó efecto del sexo ni de la interacción sexo*hora (Cuadro 1). Las concentraciones de T4 aumentaron al momento de la ingesta y se mantuvieron altas hasta las 4 horas posteriores a la misma; los niveles disminuyeron a las 6 horas post-ingesta (Figura 2 B). Las concentraciones de T4 estuvieron positivamente correlacionadas con las de insulina ($r=0.35$, $P=0.03$, $n=35$).

En contraste, las concentraciones de TSH no fueron afectadas ni por sexo ni por la hora, pero se encontró una tendencia a la interacción entre ambos ($P=0.15$). Mientras que los niveles de TSH en las hembras aumentaron a las 6 hs post-ingesta comparado con los niveles pre-ingesta ($P=0.03$); en los machos los niveles tendieron a disminuir a las 6 hs post-ingesta respecto de las concentraciones a las 2 hs post-ingesta ($P=0.14$; Figura 2 C).

DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que aún dentro de los rangos normales existen variaciones de acuerdo con la hora de muestreo post-ingesta y al género en determinados parámetros metabólicos y endocrinos. Si bien este trabajo confirma hallazgos previos o esperables de la fluctuación de metabolitos y hormonas respecto de la ingesta, es el primero en determinarlos para tiroxina y cortisol. Uno de los hallazgos más interesantes y originales del estudio son las concentraciones más altas de insulina y cortisol encontradas en las hembras, que se añaden a reportes en el mismo sentido respecto a lo que sucede con las concentraciones de colesterol.

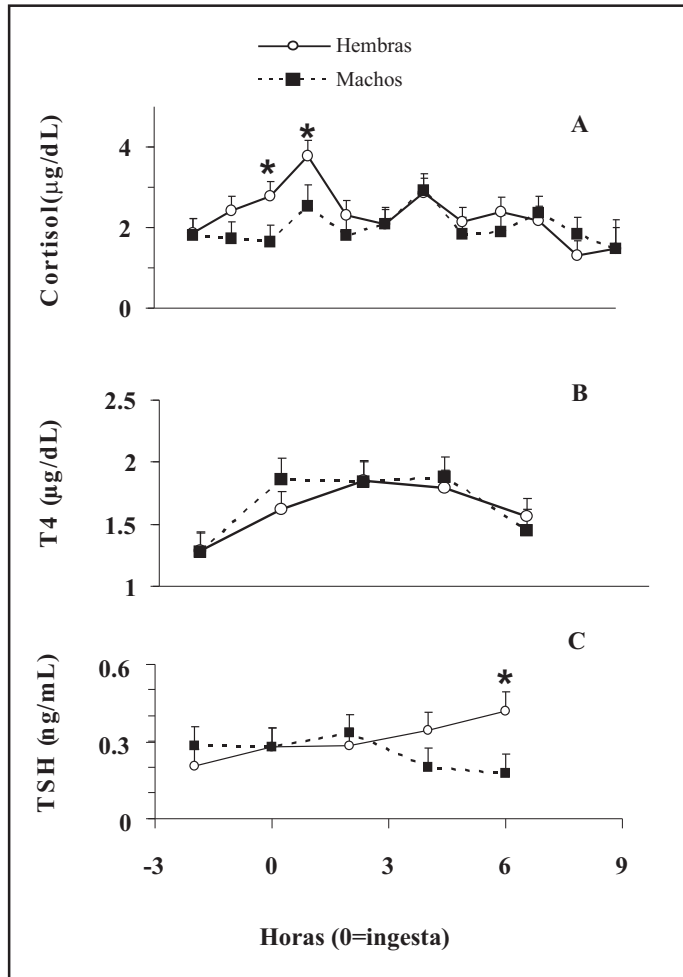


Figura 2. Concentraciones de cortisol (A), tiroxina (B) y TSH (C) en plasma de 7 perros Cocker Spaniel sanos machos y hembras antes y después de la ingesta. Los asteriscos indican diferencias entre género, $P < 0.05$.

Cabe señalar que todos los valores observados en este estudio para metabolitos y hormonas se encontraron dentro de los rangos fisiológicos normales descritos en la bibliografía para perros adultos sanos (Farver, 1997).

En este estudio, no se encontraron variaciones relevantes de la glucosa sanguínea. Por el contrario, Nyugen y col., (1998) y Brambillasca y col., (2010) demostraron importantes cambios en la glicemia dependiendo del tipo de ingesta entre los 15 a 60 minutos post-ingesta. Por la metodología de muestreo no podemos aseverar que no existieron cambios previos en los niveles de glucosa (es decir, cam-

bios rápidos post-ingesta antes de la hora), pero los niveles encontrados a la hora y dos horas post-ingesta no se modificaron a diferencia de lo reportado por Nyugen y col., (1998) y Brambillasca y col., (2010). Es sabido que la glicemia está finamente regulada, por lo que no se esperaban grandes variaciones de la misma. Es interesante señalar que la concentración más baja de glucosa se encontró a las 3 horas post-ingesta conjuntamente con los niveles más elevados de insulina, lo que concuerda con el rol estimulante de ésta favoreciendo el transporte de glucosa hacia la célula. Por otro lado, la ingesta estimula rápidamente la secreción de in-

ulina por parte de los islotes pancreáticos provocando un aumento importante y sostenido en el tiempo, como ha sido comunicado previamente (Wolever y col., 1998). Ishioka y col., (2005) observaron niveles de insulina más altos entre las 2 y 5 horas post-ingesta, lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio.

La disminución en la concentración de AGNE desde la hora de la ingesta hasta las 4 y 6 h post-ingesta, podría explicarse por el ingreso de nuevos nutrientes al organismo y una disminución de la lipólisis. Por otro lado, se encontró un aumento a la hora 8 post-ingesta, el cual podría deberse a que se han consumido las reservas energéticas de primera elección (glucógeno hepático) y se activan los mecanismos lipolíticos para consumir la grasa almacenada. Este aumento en ácidos grasos fue consistente con la disminución encontrada en las concentraciones de insulina. En contraposición, Bertolucci y col., (2008) no encontraron cambios en la concentración de AGNE post-ingesta, pero sí reportaron aumentos en las concentraciones de colesterol a las 7 horas luego de la misma. Esto se contradice con lo reportado en el presente trabajo en donde las concentraciones de colesterol no variaron post-ingesta. Metodologías diferentes y/o tipos de dieta podrían ser la causa de estas contradicciones entre trabajos.

No hemos encontrado reportes en la bibliografía respecto de variaciones de las concentraciones post-ingesta de albúmina en caninos. Siendo que la albúmina representa alrededor de un 50% de las proteínas totales, hubiera sido esperable una variación conjunta de ambas variables y no hemos encontrado una explicación para este hallazgo. La correlación encontrada entre proteínas plasmáticas e insulina reafirma el rol anabólico de esta hormona que estimula la síntesis de macromoléculas en general.

El aumento de tiroxina post-ingesta es consistente con reportes en los cuales se demostró que la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) está modulada por la ingesta en otras especies (Popovic y Duntas, 2005). La correlación positiva encontrada entre insulina y T4, sostiene la hipótesis de que la insulina actúa centralmente como señal de disponibilidad de energía promoviendo la secreción de

Cuadro 1. Valores de P para los efectos fijos considerados para los metabolitos y hormonas estudiados.

	Sexo	Hora	Sexo*Hora
Glucosa	NS	**	NS
Colesterol	***	NS	NS
AGNE	NS	***	NS
Proteínas totales	NS	0.14	NS
Albúmina	NS	0.06	NS
Insulina	0.128	***	NS
Cortisol	0.083	**	NS
T4	NS	**	NS
TSH	NS	NS	0.15

AGNE = ácidos grasos no esterificados; T4 = Tiroxina; TSH = Hormona estimulante de la tiroides. NS = no significativo, ** = P<0.01 y *** = P<0.001.

TRH como ha sido sugerido previamente en roedores (McCarty, 1995). A su vez, el aumento de T4 correspondiente aumenta la tasa metabólica y la respiración celular.

Los niveles de colesterol variaron de acuerdo al sexo, presentando las hembras niveles más altos. Esto es consistente con trabajos previos en diferentes razas caninas de otros laboratorios (Kaspar y Norris, 1977; Barrie y col., 1993) y el nuestro propio (Pessina y col., 2009); siendo la diferencia entre un 15 – 20 % mayor en las hembras. No hemos encontrado otros trabajos respecto al efecto del sexo sobre las concentraciones de metabolitos en caninos.

El efecto del género en las concentraciones hormonales fue uno de los hallazgos más interesantes de este trabajo. En el presente estudio hemos encontrado que los niveles de cortisol tendieron a ser mayores en las hembras que en los machos; observándose esta diferencia en el momento de la ingesta y una hora después de la misma. En un trabajo reciente (Pessina y col., 2009), no hemos encontrado efecto del género en los niveles basales de cortisol, pero la respuesta al test de estimulación con ACTH - en términos de concentraciones de cortisol - es significativamente mayor en las hembras que

en los machos. Se debe destacar que en el presente experimento, las mayores concentraciones de cortisol encontradas en las hembras fueron asociadas a la ingesta; lo que sugiere que es la respuesta a la ACTH endógena liberada por el estrés del manejo (alimentación). Es decir, ambos experimentos sugieren una respuesta diferencial de género a la ACTH. Una de las razones que explicarían este hallazgo, es que las concentraciones del precursor del cortisol - el colesterol - son más altas en hembras que en machos, como ha sido reportado previamente (Pessina y col., 2009). La correlación positiva entre cortisol y colesterol sostiene esta hipótesis. No hemos encontrado otro trabajo en caninos que fundamente dicho efecto, aunque en otras especies (humanos, rumiantes) se demostró que las concentraciones de leptina (hormona peptídica secretada principalmente por el tejido adiposo) son mayores en hembras que en machos y esto se asoció con una distribución diferencial de la grasa acorde al sexo (Woods y col., 2003; Ishioka y col., 2007).

En el mismo sentido, las concentraciones de insulina fueron mayores en las hembras a las 3 horas post-ingesta y no tenemos una explicación evidente para este hallazgo. En ovejas se encontró que los niveles de insulina aumentaban alrededor

del estro asociados a los altos niveles de estradiol- 17 β (Sosa y col., 2006). En ratas, se ha demostrado que los estrógenos aumentan la secreción pancreática de insulina (Nadal y col., 1998; Morimoto y col., 2001), por lo que podría sugerirse una posible influencia de los estrógenos sobre los niveles de insulina en las perras del presente trabajo, aunque con nuestros datos no disponemos de elementos para demostrarlo.

CONCLUSIÓN

Resumiendo, en este estudio se demostró que en perros adultos sanos determinados parámetros metabólicos varían de acuerdo al sexo y a la hora de muestreo tras la ingesta. Los hallazgos son consistentes en señalar que de existir diferencias acorde al género, las hembras presentan mayores concentraciones de hormonas y metabolitos en general. Estos resultados deberían tenerse en cuenta a la hora de elegir un protocolo de muestreo adecuado para determinar algunos parámetros sanguíneos que puedan estar influenciados por dichos factores. Dado que en el presente estudio se observaron fluctuaciones post-ingesta, se sugiere que en la medida de lo posible, dicho muestreo se realice en ayunas o lejos de la comida.

Referencias Bibliográficas

- Bertolucci, C.; Fazio, F.; Piccione, G.** (2008). Daily Rhythms of Serum Lipids in Dogs: Influences of Lighting and Fasting Cycles. *Comparative Medicine*. 58 (5): 485–489.
- Brambillasca, S.; Purtscher, F.; Britos, A.; Repetto, J.L.; Cajarville, C.** (2010). Digestibility, fecal characteristics, and plasma glucose and urea in dogs fed a commercial dog food once or three times daily. *Can Vet J*. 51(2):190-4.
- Hoh, W.; Oh, T.** (2006). Circadian variations of serum thyroxine, free thyroxine and 3,5,3' triiodothyronine concentrations in healthy dogs. *J. Vet. Sci.* 7(1): 25–29.
- Ishioka, K.; Hosoya, K.; Kitagawa, H.; Shibata, H.; Honjoh, T.; Kimura, K.; Saito, M.** (2007). Plasma leptin concentration in dogs: effects of body condition score, age, gender and breeds. *Res. Vet. Sci.* 82(1):11-5.
- Ishioka, K.; Hatai, H.; Komabayashi, K.; Soliman, M.M.; Shibata, H.; Honjoh, T.; Kimura, K.; Saito, M.** (2005). Diurnal variations of serum leptin in dogs: effects of fasting and feeding. *Vet. J.* 169(1):85-90.
- Farver, T.** (1997). Concepts of Normality in Clinical Biochemistry, In: Kaneko, J J.; Harvey, J W.; Bruss, M (Eds), *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th Ed.
- Kaspar, L.V.; Norris, W.P.** (1977). Serum chemistry values of normal dogs (beagles): associations with age, sex, and family line. *Lab. Anim. Sci.* 27(6):980-5.
- Kraft, W.; Weskamp, M.; Dietl, A.** (1994). Serum cholesterol in the dog. *Tierarztl. Prax.* 22(4):392-7.
- McCarty, M.F.** (1995). Central insulin may up-regulate thyroid activity by suppressing neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus. *Med Hypotheses*. 45(2):193-9.
- Morimoto, S.; Cerbón, M.A.; Alvarez-Alvarez, A.; Romero-Navarro, G.; Díaz-Sánchez, V.** (2001). Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the oestrous cycle. *Life Sci.* 68: 2979–2985.
- Nadal, A.; Rovira, J.M.; Ouahiba, L.; Leon-Quinto, T.; Andreu, E.; Ripoll, C.; Soria, B.** (1998). Rapid insulinotropic effect of 17 β - estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J.* 12: 1341–1348.
- Nguyen, P.; Dumon, H.; Biourge, V.; Pouteau, E.** (1998) Measurement of postprandial incremental glucose and insulin changes in healthy dogs: influence of food adaptation and length of time of blood sampling. *J. Nutr.* 128 (12):2659S -2662S.
- Nguyen, P.; Dumon, H.; Biourge, V.; Pouteau, E.** (1998). Glycemic and insulinemic responses after ingestion of commercial foods in healthy dogs: influence of food composition. *J. Nutr.* 128(12):2654S -2658S.
- Pessina, P.; Fernández-Foren, A.; Cueto, E.; Delucchi, L.; Castillo, V.; Meikle, A.** (2009). Cortisol secretion after adrenocorticotrophin (ACTH) and dexamethasone tests in healthy female and male dogs. *Acta Vet Scand* 17;51:33.
- Popovic, V.; Duntas, L.H.** (2005). Leptin TRH and ghrelin: influence on energy homeostasis at rest and during exercise. *Horm Metab Res* 37(9): 533-7.
- Reimers, T.J.; Lawler, D.F.; Sutaria, P.M.; Correa, M.T.; Erb, H.N.** (1990). Effects of age, sex, and body size on serum concentrations of thyroid and adrenocortical hormones in dogs. *Am J Vet Res.* 51:454-457.
- Sosa, C.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Viñoles, C.; Tasende, C.; Valares, J.A.; Martin, G.B.; Meikle, A.** (2006). Effect of undernutrition on endometrial gene expression of progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 447-458.
- Treiber, K.H.; Boston, R.C.; Kronfeld, D.S.; Staniar, W.B.; Harris, P.A.** (2005). Insulin resistance and compensation in Thoroughbred weanlings adapted to high-glycemic meals. *J. Anim. Sci.* 83:2357-2364.
- Wolever, T.M.; Chiasson, J.L.; Csima, A.; Hunt, J.A.; Palmason, C.; Ross, S.A.; Ryan, E.A.** (1998). Variation of postprandial plasma glucose, palatability, and symptoms associated with a standardized mixed test meal versus 75 g oral glucose. *Diabetes Care.* 21(3):336 - 40.
- Woods, S.C.; Gotoh, K.; Clegg, D.J.** (2003). Gender difference in the control of energy homeostasis. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 228(10):1175-80.