

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

GUSTAVO DITTRICH

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA CANINA E SEUS EFEITOS
SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR E A DETERMINAÇÃO DA DISPERSÃO
DA ONDA P EM CÃES OBESOS**

**ASSESSMENT OF CANINE SERUM LEPTIN LEVELS AND THE EFFECTS ON
THE CARDIOVASCULAR SYSTEM AND THE DETERMINATION OF P WAVE
DISPERSION IN OBESE DOGS**

CURITIBA

2016

GUSTAVO DITTRICH

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA CANINA E SEUS EFEITOS
SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR E A DETERMINAÇÃO DA DISPERSÃO
DA ONDA P EM CÃES OBESOS**

**ASSESSMENT OF CANINE SERUM LEPTIN LEVELS AND THE EFFECTS ON
THE CARDIOVASCULAR SYSTEM AND THE DETERMINATION OF P WAVE
DISPERSION IN OBESE DOGS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Tostes de Oliveira Stedile

CURITIBA

2016

D617 Dittrich, Gustavo

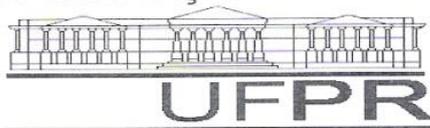
Avaliação dos níveis séricos de leptina canina e seus efeitos sobre o sistema cardiovascular e a determinação da dispersão da onda P em cães obesos. / Gustavo Dittrich. – Curitiba : 2016. 55 f. il.

Orientadora: Simone Tostes de Oliveira Stedile.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

1. Cães - Obesidade. 2. Sistema cardiovascular – Distúrbios. 3. Medicina Veterinária. I. Stedile, Simone Tostes de Oliveira. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 619:636.7

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA CANINA E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR E A DETERMINAÇÃO DA DISPERSÃO DA ONDA P EM CÃES OBESOS**” apresentada pelo Mestrando **GUSTAVO DITTRICH** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato apto para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 30 de março de 2016

Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Tatiana Champion
Membro

Professor Dr. Marlos Gonçalves Sousa
Membro

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da elaboração desta dissertação, o meu muito obrigado. Não poderia deixar de agradecer em especial:

À Patrícia, pelo companheirismo, amor e carinho nestes 9 anos de convívio.

Aos meus exemplos de vida, meus pais, Roberto e Thaís, pelo apoio incondicional, por sempre estimularem a sede de conhecimento e almejarem o enriquecimento da minha formação profissional e pessoal. Saliento minha gratidão à minha mãe por ter realizado meticulosamente a dosagem de leptina sérica canina. Não é qualquer pessoa que tem a oportunidade de trabalhar e aprender junto a sua mãe, inclusive em laboratório!

Ao meu irmão Fábio e sua esposa Mariana que, mesmo distantes, me ajudaram com dúvidas de idioma, estatística e informática, além de estarem presentes em momentos de diversão e entretenimento.

À professora orientadora Simone Tostes de Oliveira Stedile e ao professor co-orientador Marlos Gonçalves Sousa pelo auxílio e norteamo ao longo deste trabalho, além de sanar as inúmeras dúvidas. Obrigado pela oportunidade de termos trabalhado juntos.

Ao professor João Carlos Minozzo por ter estabelecido o contato e às professoras Juliana Ferreira de Moura e Larissa Magalhães Alvarenga por autorizarem a realização da dosagem de leptina no Laboratório de Imunoquímica-LIMK da Universidade Federal do Paraná. Também agradeço à mestranda Sabrina Karim Silva pela recepção no laboratório, boa vontade e apoio na realização dos exames.

Aos professores, funcionários, alunos, estagiários, pós-graduandos e principalmente aos residentes do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (HV-UFPR). Passei dois anos na rotina do HV-UFPR e conheci pessoas maravilhosas que fizeram com que o ambiente de trabalho se tornasse um local cheio de descontração e risadas. Ainda, agradeço pelo auxílio na seleção dos animais, bem como na coleta de amostras e realização de exames.

RESUMO

A presente dissertação está dividida em três capítulos. O primeiro capítulo introduz brevemente o leitor a respeito das consequências da obesidade em cães, sobretudo em relação ao sistema cardiovascular. A identificação do adipócito como uma fonte de produção de peptídeos biologicamente ativos denominados de adipocinas é um elo fundamental na identificação de alterações no sistema cardiovascular. O segundo capítulo aborda os efeitos da hiperleptinemia, caracterizada por um estado de elevação crônica de leptina presente em indivíduos obesos, em relação à morfologia e função do coração, correlacionando os níveis desta adipocina com parâmetros clínicos e ecocardiográficos. Além de culminar em alterações referentes à estrutura e funcionalidade cardíaca, a obesidade pode levar a distúrbios na condução elétrica do coração, sendo um fator de risco para o desenvolvimento de arritmias atriais e ventriculares. Sendo assim, o terceiro capítulo determina os valores da dispersão da onda P em cães com obesidade, discorrendo sobre os efeitos do prolongamento deste índice eletrocardiográfico.

Palavras-chave: obesidade, hiperleptinemia, adipocinas, índice de onda P.

ABSTRACT

This study is divided into three chapters. The first one briefly introduces the reader about the consequences of obesity in dogs, especially concerning the cardiovascular system. The identification of adipocytes as a source of production of biologically active peptides known as adipokines is a key link in the identification of changes in the cardiovascular system. The second chapter discusses the effects of hyperleptinemia, a chronic state of elevated levels of leptin, regarding cardiac morphology and function. Furthermore, we correlated leptin levels with clinical and echocardiographic parameters. Besides causing changes in cardiac structure which culminates in impaired functions, obesity can lead to disturbances in the electrical conduction of the heart and is considered a risk factor for the development of atrial and ventricular arrhythmias. Thus, the third section determines the values of P wave dispersion in dogs with obesity and discusses the effects of this electrocardiographic index.

Key-words: obesity, hyperleptinemia, adipokines, P wave index.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 OBJETIVO GERAL	10
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA CANINA E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR	12
2.1 RESUMO.....	12
2.2 ABSTRACT	12
2.3 INTRODUÇÃO	13
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.5 RESULTADOS	21
2.6 DISCUSSÃO	27
2.7 CONCLUSÃO.....	33
2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
3 DETERMINAÇÃO DA DISPERSÃO DA ONDA P EM CÃES OBESOS	39
3.1 RESUMO.....	39
3.2 ABSTRACT	39
3.3 INTRODUÇÃO	40
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.5 RESULTADOS	43
3.6 DISCUSSÃO	46
3.7 CONCLUSÃO.....	48
3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
5 ANEXOS	53

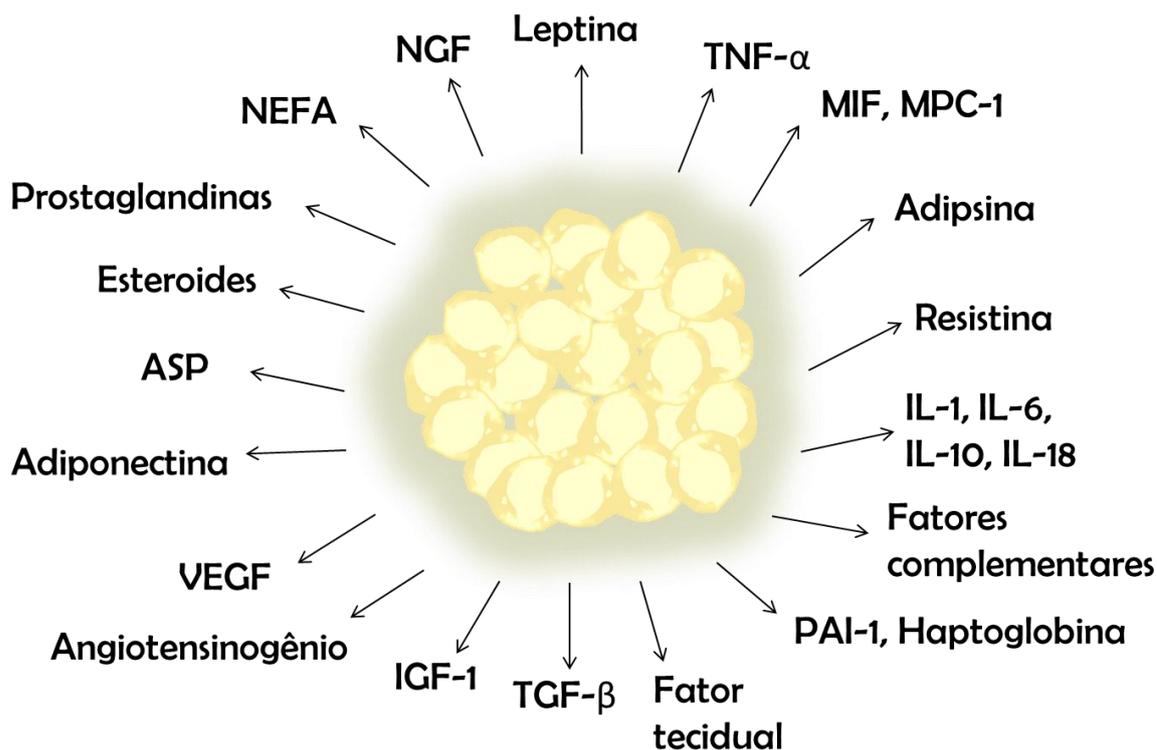
1 INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é classificado como conjuntivo frouxo, sendo composto por diversos tipos celulares, destacando-se os pré-adipócitos, adipócitos, células-tronco mesenquimais, células endoteliais, nervosas e de defesa. O adipócito, também conhecido como lipócito ou célula de gordura, é a principal estrutura deste tecido, constituindo cerca de 50% de todo conteúdo celular (ZORAN, 2010). Apresenta diâmetros que variam entre 10 a 100 μm , sendo especializado no armazenamento de energia na forma de gordura. O adipócito é considerado a unidade anatomofuncional endocrinologicamente ativa deste órgão, secretando substâncias que desempenham importantes funções sistêmicas no organismo (LEAL & MAFRA, 2013).

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de tecido adiposo, sendo resultante de um desequilíbrio entre a energia ingerida e a energia consumida (MACHADO, 2012). Esta condição também está relacionada a uma desproporção na distribuição de gordura pelo corpo. A prevalência de sobrepeso e obesidade nos seres humanos e nos animais domésticos vem aumentando exponencialmente nos últimos anos, apresentando proporções epidemiológicas preocupantes (GERMAN, 2006). Na medicina veterinária, especificamente na espécie canina, a incidência da obesidade varia entre 22% e 44% (ZORAN, 2010).

Esta alteração da condição corporal está relacionada a um estado pró-inflamatório crônico, levando ao aparecimento de comorbidades decorrentes da supernutrição, o que diminui a qualidade e a expectativa de vida do animal acometido e torna a obesidade um importante tema de estudo (ZORAN, 2010). Pesquisas recentes têm focado na investigação sobre a fisiopatologia da obesidade e suas consequências sobre o sistema cardiovascular de seres humanos (ABEL et al., 2008; LAVIE et al., 2009; MARINOU et al., 2010; HUANG & LEE, 2012). Além de ser um órgão de armazenamento de gordura e que participa da termorregulação, o tecido adiposo tem a função de secretar diversos polipeptídeos bioativos conhecidos como adipocinas (LEAL & MAFRA, 2013). As adipocinas atuam principalmente no controle do apetite e ingestão alimentar devido às comunicações entre o tecido periférico e o centro hipotalâmico. Ainda, estão relacionadas a ações em diversos sistemas do organismo, como o sistema imunológico e cardiovascular, além de regular os níveis eletrolíticos e a homeostase da glicose (ZORAN, 2010). Entretanto,

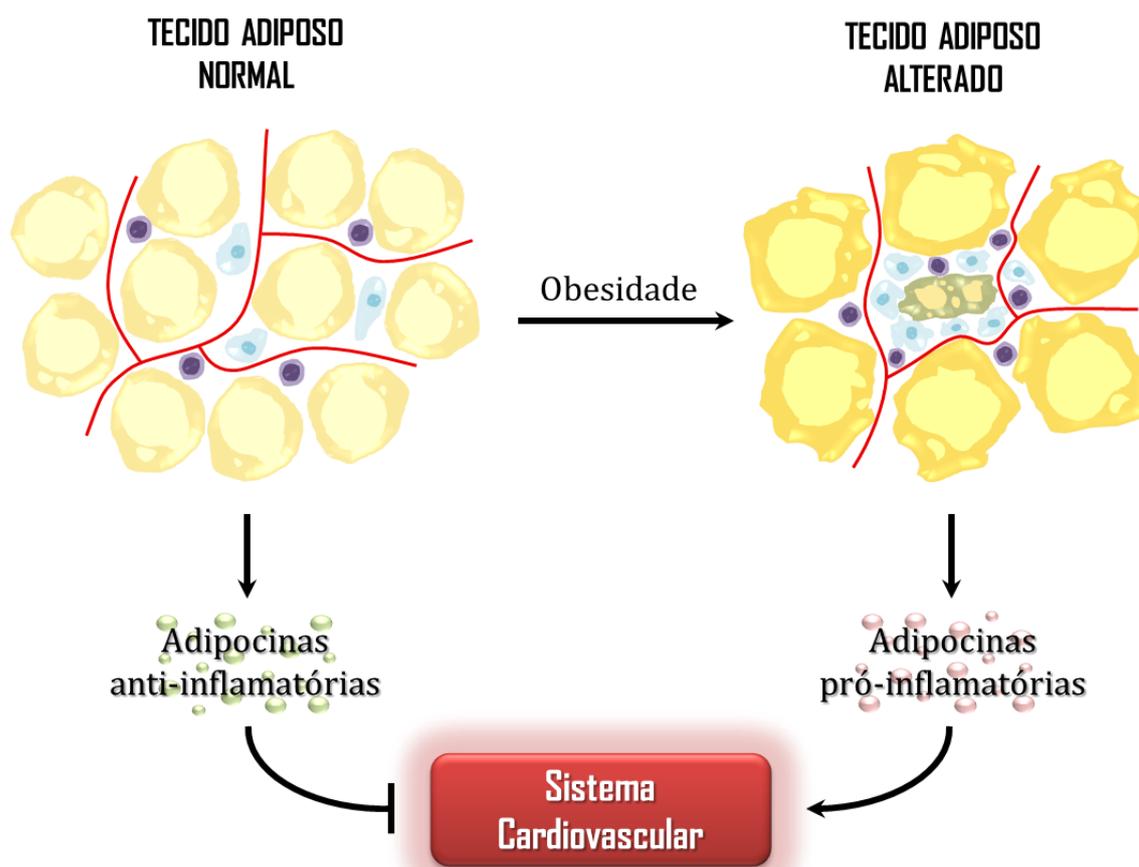
em indivíduos obesos, o perfil das adipocinas se altera frente à quantidade e condição do tecido adiposo, tendo como consequência o aparecimento de distúrbios metabólicos que aumentam o risco de doenças sistêmicas. Estudos em pacientes humanos obesos revelaram mudanças estruturais no coração, como deposição de gordura nas células do sistema de condução, hipertrofia ventricular, além de obstruções coronarianas (ABEL et al., 2008).



(Adaptado de ZORAN, 2010).

Figura 1 – Ilustração dos adipócitos do tecido adiposo branco, listando algumas das adipocinas (hormônios e citocinas) secretas por este tecido. ASP: proteína estimulante de acilação; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; IL-1-6-10-18: interleucinas 1-6-10-18; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1; MIF: fator de inibição de migração de macrófagos; NEFA: ácidos graxos não esterificados; NFG: fator de crescimento do nervo; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1; TGF- β : fator de crescimento tumoral- β ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

A obesidade culmina em um aumento na expressão de adipocinas pró-inflamatórias – destacam-se a leptina, TNF- α , fator inibidor do plasminogênio, resistina, omentina, IL-6 e o angiotensinogênio – e uma diminuição de adipocinas anti-inflamatórias – sobretudo a adiponectina (NAKAMURA et al., 2014). O desequilíbrio dos níveis de adipocinas tem sido relacionado como um dos fatores responsáveis por processos de disfunção metabólica e dishomeostase, contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Figura 2).



(Adaptado de NAKAMURA et al., 2014)

Figura 2 – Comparação estrutural e funcional do tecido adiposo entre organismos com e sem obesidade, demonstrando a produção de adipocinas de caráter pró-inflamatório e anti-inflamatório, bem como sua relação com o sistema cardiovascular.

São reconhecidos vários tipos de adipocinas pró-inflamatórias que desempenham diferentes ações no organismo, destacando-se principalmente a leptina. A ligação da leptina ao seu receptor no centro hipotalâmico resulta em uma série de acontecimentos no organismo que conduzem à saciedade alimentar (LEAL & MAFRA, 2013). Entretanto, organismos obesos desenvolvem mecanismos de resistência à ação da leptina, seja por problemas em seus receptores ou defeitos na passagem do hormônio pela barreira hematoencefálica. Como resultado da incapacidade da ação da leptina, o centro de saciedade não é ativado e ocorre manutenção do balanço energético positivo, com maior acúmulo de gordura. Por consequência, o organismo desenvolve hiperleptinemia associada à resistência à leptina, resultando na ligação deste hormônio em seus receptores periféricos, principalmente alocados no coração e células endoteliais (YANG & BAROUCH, 2007).

Diante da elevada prevalência de cães com obesidade e da escassez de informações sobre o nível de leptina em cães e os efeitos da obesidade sobre o sistema cardiovascular, o Capítulo 2 dessa dissertação discute a ação e modulação de caráter inflamatório e sistêmico da leptina que contribuem para o desenvolvimento de alterações cardiovasculares em cães obesos.

Além de alterações de caráter inflamatório sobre o sistema cardiovascular, a condução elétrica cardíaca também pode sofrer consequências decorrentes da obesidade, refletindo em alterações no exame de eletrocardiografia e, eventualmente, levar ao surgimento de arritmias cardíacas. No que tange à eletrocardiografia, a duração da onda P reflete as propriedades eletrofisiológicas do sistema de condução atrial. A dispersão de onda P é um índice definido como a diferença entre a duração mínima e a duração máxima da onda P em diferentes derivações do exame eletrocardiográfico (SEYFELI et al., 2006). É um índice que reflete a propagação descontínua e não homogênea dos impulsos sinusais, indicando o prolongamento do tempo de condução atrial (KOSAR et al., 2008). Em humanos, a dispersão de onda P é um parâmetro que tem sido utilizado como predição para o desenvolvimento de arritmias supraventriculares, sobretudo a fibrilação atrial (SILVA et al., 2013). Além disso, já é constatado que pessoas obesas apresentam maior valor de dispersão de onda P, sugerindo que esta seja uma condição associada a um risco aumentado no desenvolvimento da fibrilação atrial (KOSAR et al., 2008). Na medicina veterinária há poucos trabalhos que avaliam a dispersão de onda P em cães. No trabalho de Noszczyk-Nowak et al.(2011), cães com doença valvar crônica apresentaram maior valor de dispersão de onda P quando comparados a cães saudáveis, embora nenhuma correlação significativa entre este parâmetro e o tamanho do átrio esquerdo tenha sido verificada. Em cães com distúrbios de condução inter e intra-atrial, a dispersão de onda P também é expressivamente elevada (NOSZCZYK-NOWAK, 2012).

Ainda não existem estudos que verificam a relação entre a dispersão de onda P e a obesidade em cães, bem como sua relação com arritmias cardíacas ou aumento de câmaras cardíacas. Tendo em vista a carência destas informações, o Capítulo 3 desta dissertação apresenta os valores da duração de onda P, bem como a sua dispersão, comparando e correlacionando as medidas de onda P com parâmetros clínicos e ecocardiográficos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as alterações estruturais e funcionais do sistema cardiovascular de cães com obesidade.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as alterações ecocardiográficas de cães obesos;
- Verificar se a leptina pode ser um índice de adiposidade em cães;
- Correlacionar os níveis séricos de leptina com parâmetros ecocardiográficos;
- Determinar os valores da duração e da dispersão da onda P em cães obesos;
- Correlacionar os valores da dispersão da onda P com o tamanho do átrio esquerdo.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E. D.; LITWIN, S. E.; SWEENEY, G. Cardiac remodeling in obesity. **Physiol Rev**, 2008; 88:389–419.

GERMAN, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats. **J Nutr**, 2006; 136:1940S-1946S.

HUANG, C. Y.; LEE, S. D. Possible pathophysiology of heart failure in obesity: Cardiac apoptosis. **Biomedicine**, 2012; 2:36-40.

KOSAR, F.; AKSOY, Y.; ARI, F.; KESKIN, L.; SAHIN, I. P-wave duration and dispersion in obese subjects. **Ann Noninvasive Electrocardiol**, 2008; 13(1):3–7.

LAVIE, C. J.; MILANI, R. V.; VENTURA, H. O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. **J Am Coll Cardiol**, 2009; 53(21):1925-1932.

LEAL, V. O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, 2013; 419:87–94.

MACHADO, F. L. A. Avaliação das concentrações séricas de adiponectina e sua correlação com obesidade e endocardiose de valva mitral em cães. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área: Clínica Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária, **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2012.

MARINOU, K.; TOUSOULIS, D.; ANTONOPOULOS, A. S.; STEFANADI, E.; STEFANADIS, C. Obesity and cardiovascular disease: From pathophysiology to risk stratification. **Int J of Cardiol**, 2010; 138:3–8.

NAKAMURA, K.; FUSTER, J. J.; WALSH, K. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. **J Cardiol**, 2014; 63(4):250-259.

NOSZCZYK-NOWAK, A. P-wave dispersion in prediction of maintenance of sinus rhythm after an electrical cardioversion of atrial fibrillation in dogs. **Bull Vet Inst Pulawy**, 2012; 56:99-102.

NOSZCZYK-NOWAK, A.; SZALAS, A.; PASLAWSKA, U.; NICPON, J. Comparison of P-wave dispersion in healthy dogs, dogs with chronic valvular disease and dogs with disturbances of supraventricular conduction. **Acta Vet Scand**, 2011; 53:18.

SEYFELI, E.; DURU, M.; KUVANDIK, G.; KAYA, H.; YALCIN, F. Effect of obesity on P-wave dispersion and QT dispersion in women. **Int J Obes**, 2006; 30:957–961.

SILVA, R. M. F. L.; KAZAZ, N. M.; TORRES, R. M.; MOREIRA, M. C. V. Dispersão da onda P e índice de volume do átrio esquerdo como preditores na insuficiência cardíaca. **Arq. Bras. Cardiol**; 2013; 100(1):67-74.

YANG, R.; BAROUCH, L. A. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. **Circ Res**, 2007; 101:545-559.

ZORAN, D. L. Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. **Vet Clin Small Anim**, 2010; 40:221–239.

2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA CANINA E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Assessment of canine serum leptin levels and the effects on the cardiovascular system

2.1 RESUMO

A leptina é um hormônio derivado do tecido adiposo que atua majoritariamente na regulação da saciedade. Entretanto, o estado de hiperleptinemia verificado em indivíduos obesos proporciona uma série de distúrbios no sistema cardiovascular. O objetivo deste trabalho foi determinar as alterações cardiovasculares em cães com obesidade, correlacionando-as com os níveis séricos de leptina canina. Foram selecionados 76 cães, sendo triados e classificados quanto à condição corporal e presença de cardiopatia valvar, formando quatro grupos distintos: obeso (Ob), obeso-cardiopata (ObCar), cardiopata (Car) e controle (Con). Foram realizados exames laboratoriais, incluindo a dosagem de leptina sérica, além de ecocardiografia e mensuração da pressão arterial sistêmica (PAS). Foi verificado maior média de leptina em cães com obesidade (grupos Ob e ObCar), que também apresentaram valores elevados de PAS sistólica e de índices ecocardiográficos relacionados à hipertrofia excêntrica e concêntrica. A leptina, por sua vez, apresentou correlação com os parâmetros ecocardiográficos diastólicos VE_{A_0} (diâmetro interno do ventrículo esquerdo) e $PLVE_{A_0}$ (parede livre do ventrículo esquerdo) nos grupos Ob e ObCar. Sendo assim, verificou-se que a leptina pode estar associada a várias alterações no sistema cardiovascular em cães com obesidade. Estudos sobre as ações sistêmicas das adipocinas são fundamentais para a determinação do elo entre a obesidade e diversas enfermidades.

Palavras chave: obesidade, adipocinas, hipertensão, hipertrofia miocárdica.

2.2 ABSTRACT

Leptin is a hormone derived from the adipose tissue that acts mainly in the regulation of satiety. However, a state of chronic hyperleptinemia found in obese subjects provides numerous disturbances in the cardiovascular system. This study aims at determining cardiovascular changes in obese dogs, as well as correlating them with serum levels of canine leptin. We have selected 76 client-owned dogs and classified them regarding their body condition and the presence of valvular heart disease, which established four distinct groups: obese (Ob), obese-cardiac (ObCar), cardiac (Car) and control (Con). Laboratory tests, which included serum leptin dosage, echocardiography and systemic blood pressure (SBP) measurement were performed. We have found higher leptin mean values in obese dogs (Ob and ObCar), which also showed elevated systolic SBP and echocardiographic indices related to eccentric and concentric myocardial hypertrophy. Leptin correlated with diastolic echocardiographic parameters, such as $LVID_{A_0}$ (left ventricular internal diameter) and LVE_{A_0} (left ventricle free wall) in the Ob and ObCar groups. Thus, we have concluded that leptin may play a role in the development of cardiovascular abnormalities in obese dogs. Further studies regarding systemic effects of adipokines are critical for determining the link between obesity and other diseases.

Keywords: obesity, adipokines, hypertension, myocardial hypertrophy.

2.3 INTRODUÇÃO

A leptina é um hormônio proveniente da decodificação do gene *ob*, sendo a adipocina mais bem caracterizada em cães e gatos (ZORAN, 2010). Sua estrutura molecular compõem ligações polipeptídicas de 167 aminoácidos formando uma proteína com peso molecular de aproximadamente 16 kDa (ABEL & SWEENEY, 2012). Sua estrutura cristalina indica que a leptina é um membro da família das citocinas e possui quatro segmentos helicoidais (MADEJ et al., 1995). Embora os adipócitos, sobretudo pertencentes ao tecido adiposo branco, sejam o principal local de síntese, o mRNA da leptina pode ser encontrado na placenta, mucosa gástrica, miócitos, medula óssea, gônadas, folículos pilosos e células epiteliais da glândula mamária de seres humanos e roedores (HOGGARD et al., 1997; SENARIS et al., 1997; BADO et al., 1998; SMITH-KIRWIN et al., 1998; WANG et al., 1998; HARRIS, 2000). Entretanto, nos animais da espécie canina, o RNAm da leptina foi encontrado somente no tecido adiposo, não havendo produção nos demais órgãos (RADIN et al., 2009).

A liberação de leptina pelos adipócitos é de forma pulsátil, seguindo o ciclo circadiano (MANTZOROS et al., 2011). Após ser secretada, a leptina se liga aos seus receptores (Ob-R), caracterizados por pertencerem à superfamília de receptores de citocinas. Foram identificadas seis isoformas dos Ob-R (Ob-R_a a Ob-R_f), com constituição, solubilidade e comprimento diferentes (HOUSEKNECHT & PORTOCARRERO, 1998). Estes receptores, especialmente da isoforma Ob-R_b, estão altamente relacionados aos centros da saciedade no hipotálamo, o que justifica o efeito anorético da leptina quando ligada a este receptor (SINGH et al., 2010). A ligação da leptina aos seus receptores no centro hipotalâmico resulta em uma série de acontecimentos no organismo que conduzem à saciedade alimentar: ocorre estimulação de neurônios anorexígenos (através da ação de neurotransmissores, como a cocaína e as anfetaminas) e supressão de neurônios orexígenos (também por liberação de neurotransmissores, principalmente de neuropeptídeos Y) (ENRIORI et al., 2006). A leptina também suprime a liberação de endocanabinoides, que atuam na regulação de neurônios orexígenos (SINGH et al., 2010; LEAL & MAFRA, 2013).

Entretanto, as isoformas longas e curtas dos Ob-R estão distribuídas amplamente em outros tecidos, refletindo o envolvimento da leptina na homeostase de processos fisiológicos (CORREIA & HAYNES, 2004; FONFARA et al., 2011).

Existem evidências que a leptina ativa, regula ou modula diversos sistemas fisiológicos, como a sensibilização da insulina, a regulação do sistema imunológico, a função reprodutiva, o controle da pressão arterial sistêmica e ações no sistema cardiovascular (HARRIS, 2000; MANTZOROS et al., 2011). A expressão do gene *ob* e consequente produção exacerbada de leptina em organismos obesos estão associadas a uma ação pleiotrópica, relacionando a leptina com múltiplas ações no organismo, o que a torna um elo fundamental no desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade (MARTIN et al., 2008).

A concentração de leptina está correlacionada à quantidade de tecido adiposo do organismo, ou seja, indivíduos obesos apresentam níveis circulantes elevados, caracterizando a leptina como um índice de adiposidade do organismo (MARTIN et al., 2008). Entretanto, foram identificados fatores que predisõem a resistência à ação da leptina. A resposta não eficiente desta adipocina nos organismos obesos pode ocorrer devido à saturação dos sistemas de transporte, caracterizada pela incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Ainda, sugere-se que defeitos na sinalização do hormônio no hipotálamo bem como a falha na ativação de neurônios-alvo também possam levar à resistência (ZORAN, 2010; ABEL & SWEENEY, 2012; LEAL & MAFRA, 2013). Como resultado da incapacidade da ação da leptina, o centro de saciedade não é ativado e ocorre manutenção do balanço energético positivo, com maior acúmulo de gordura. Por consequência, o nível circulante de leptina aumenta e o organismo desenvolve hiperleptinemia crônica associada à resistência à leptina (YANG & BAROUCH, 2007; MARTIN et al., 2008; REN et al., 2008).

A hiperleptinemia está associada a um estado pró-inflamatório crônico relacionado à obesidade, sugerindo ligação com seus efeitos biológicos periféricos (JANECKOVÁ, 2001). A leptina está relacionada com a ativação de macrófagos, produção de fator de necrose tumoral alfa e de óxido nítrico-sintase, além da proliferação e migração de células endoteliais, sugerindo que a hiperleptinemia proporciona efeitos potencialmente nocivos sobre o sistema cardiovascular (NEGRÃO & LICINIO, 2000; SWEENEY, 2010; ABEL & SWEENEY, 2012). Em humanos já foi estabelecido que o aumento desta adipocina estimula a síntese de diversas substâncias e citocinas pró-inflamatórias, como o óxido nítrico, angiotensinogênio II, catecolaminas, fator de necrose tumoral alfa, interleucinas, entre outros, que consequentemente culminam em hipertensão arterial sistêmica,

desenvolvimento de aterosclerose, aumento de cardiomiócitos, contratilidade prejudicada, apoptose de células musculares cardíacas, além de hipertrofia, fibrose e remodelamento cardíaco (CORREIA & HAYNES, 2004; YANG & BAROUCH, 2007; REN et al., 2008; BOBBERT et al., 2012). Estas alterações cardiovasculares são causas importantes de falência cardíaca, o que pode evoluir para quadro de insuficiência cardíaca congestiva.

No que tange a medicina veterinária, apesar de ainda serem escassas as informações sobre a resistência à leptina e consequente estado de hiperleptinemia crônica, este tópico tem se tornado um importante objeto de estudo. Foi estabelecida forte correlação entre valores elevados de leptina e a condição e o peso corporal de cães obesos, sugerindo que a leptina pode ser um índice de adiposidade também nos animais desta espécie (SAGAWA et al., 2002). Além disso, foi verificado que animais obesos submetidos à perda de peso apresentaram redução nos níveis circulantes de leptina quando atingiram o peso ideal (JEUSETTE et al., 2005). Os efeitos da hiperleptinemia sobre o sistema cardiovascular de cães foram abordados por Fonfara et al. (2011), que determinaram um aumento da expressão de leptina em cães com insuficiência cardíaca congestiva. Entretanto, são inexistentes as informações que correlacionam as alterações de remodelamento cardíaco com valores da leptina circulante de animais obesos e com condição corporal normal.

Tendo em vista os efeitos deletérios sistêmicos do estado de hiperleptinemia crônica, sobretudo em relação ao sistema cardiovascular, este trabalho teve como objetivo identificar as alterações cardíacas estruturais e funcionais de cães com obesidade e com condição corporal normal, correlacionando-as com os valores séricos desta adipocina.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 76 cães, de ambos os sexos, de diversas raças, com idade mínima de oito anos, de porte pequeno ou médio, recebidos para verificação da condição corporal e avaliação cardiovascular. Os animais foram triados, sendo submetidos a exame físico completo, bem como realização de ecodopplercardiografia, mensuração da pressão arterial sistêmica e coleta de sangue para exames laboratoriais e posterior dosagem de leptina.

Grupos

De acordo com a condição corporal e a presença ou não de cardiopatia, os animais foram alocados nos seguintes grupos: Grupo Controle (GCon) - cães com ECC ideal, sem doença cardíaca; Grupo Obeso (GOB) - cães com ECC indicativo de obesidade, sem doença cardíaca; Grupo Cardiopata (GCar) - cães com ECC ideal, com doença cardíaca valvar; Grupo Obeso-Cardiopata (GOBCar) - cães com ECC indicativo de obesidade, com doença cardíaca valvar.

Os animais que detinham a condição de cardiopatia valvar foram classificados de acordo com o estágio da doença cardíaca, seguindo o consenso proposto pelo *American College of Veterinary Internal Medicine* (ATKINS et al., 2009). O estágio B é dividido em B1 e B2, sendo o primeiro referente aos animais assintomáticos, que possuem alteração cardíaca ao exame físico, mas que não apresentam remodelamento cardíaco, enquanto o segundo remete aos cães também assintomáticos, mas que possuem alterações relacionadas ao remodelamento cardíaco. O estágio C compreende animais com sinais clínicos da doença e alterações nos exames de imagem, que necessitam de tratamento para controle da enfermidade. Já o estágio D engloba pacientes diagnosticados com a doença em estágio terminal, em insuficiência cardíaca refratária ao tratamento.

Crítérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa animais que apresentassem alterações ecocardiográficas condizentes com cardiopatias congênitas ou cardiomiopatias. Cães com suspeita ou confirmação de hipotireoidismo e diabetes mellitus também não foram selecionados. Não foi realizada a dosagem de cortisol sérico para investigação de hiperadrenocorticismo, entretanto, animais que apresentaram alterações hematológicas importantes relacionadas à doença não foram selecionados. Cães em tratamento com corticosteroides bem como aqueles que detinham o diagnóstico de doenças inflamatórias sistêmicas, neoplasias e infecções generalizadas foram excluídos da pesquisa.

Avaliação da condição corporal

A avaliação da condição corporal baseou-se no escore de condição corporal (ECC), na determinação do índice de massa corporal canina (IMC) e no cálculo da porcentagem de gordura corporal (%GC).

O ECC é fundamentado na inspeção e palpação do gradil costal e cintura abdominal do animal, utilizando uma tabela com escala numérica de um a nove, proposta por Laflamme (1997). Foram selecionados animais que apresentaram escores corporais definidos como condição ideal (4 e 5) e animais com obesidade (8 e 9) (Figura 1).

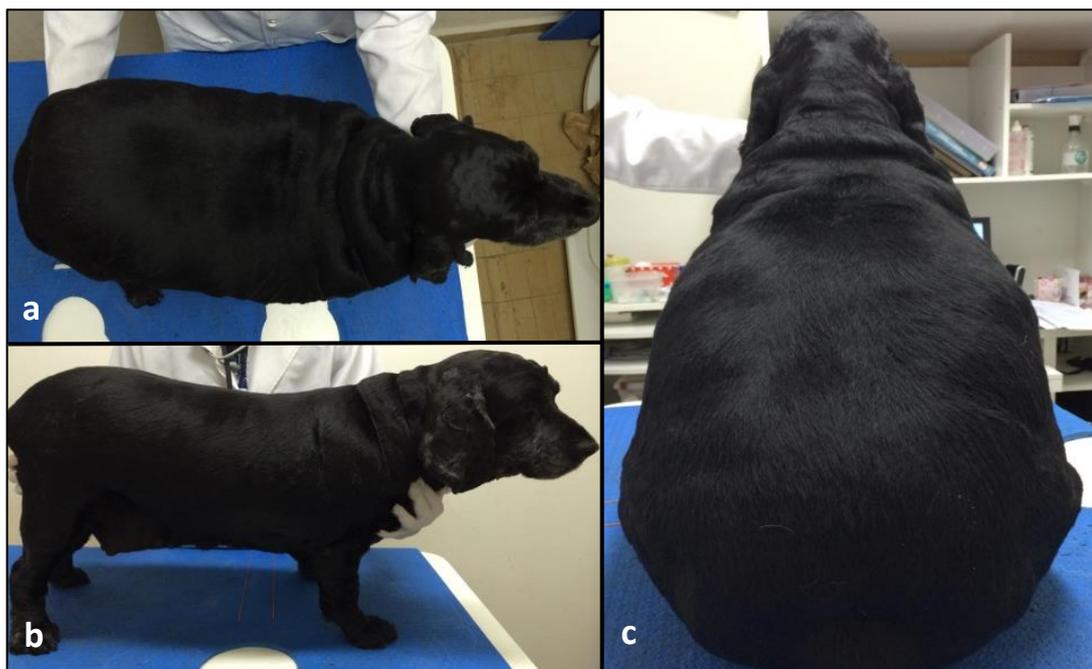


Figura 1 – Avaliação do escore de condição corporal em um cão. Nota-se a deposição de tecido adiposo em região de tórax, dificultando a definição do gradil costal (a). Também pode ser evidenciado o acúmulo de gordura em região abdominal (b), com a perda da definição da cintura abdominal e deposição de gordura em região dorsal (c).

O IMC é um método adaptado da medicina, utilizando o peso e a altura para sua determinação. A fórmula segue àquela empregada em pessoas, sendo igual à razão entre o peso e o quadrado da altura. Para a determinação da altura do cão, utilizou-se a medida do comprimento entre a extremidade do osso occipital até o final do calcâneo (MUELLER et al., 2008) (Figura 2).



Figura 2 – Verificação da altura dos cães. Utilizou-se fita métrica para mensuração a partir da extremidade do osso occipital até o final do calcâneo.

A %GC foi determinada através da mensuração de medidas morfométricas em sítios específicos através do uso de fita métrica simples. Para tal, mediu-se a distância entre a tuberosidade do calcâneo e o ligamento patelar médio, compreendendo a extensão do membro pélvico (MP_{cm}), além da determinação do perímetro abdominal (PA_{cm}), sendo o valor obtido no ponto médio entre a asa do íleo e a última vértebra torácica (Figura 3). Estas medidas permitiram o cálculo da %GC, seguindo a fórmula proposta por Burkholder & Toll (2000):

- Machos: $\%GC = (-1,4 \times MP_{cm}) + (0,77 \times PA_{cm}) + 4$
- Fêmeas: $\%GC = (-1,7 \times MP_{cm}) + (0,93 \times PA_{cm}) + 5$

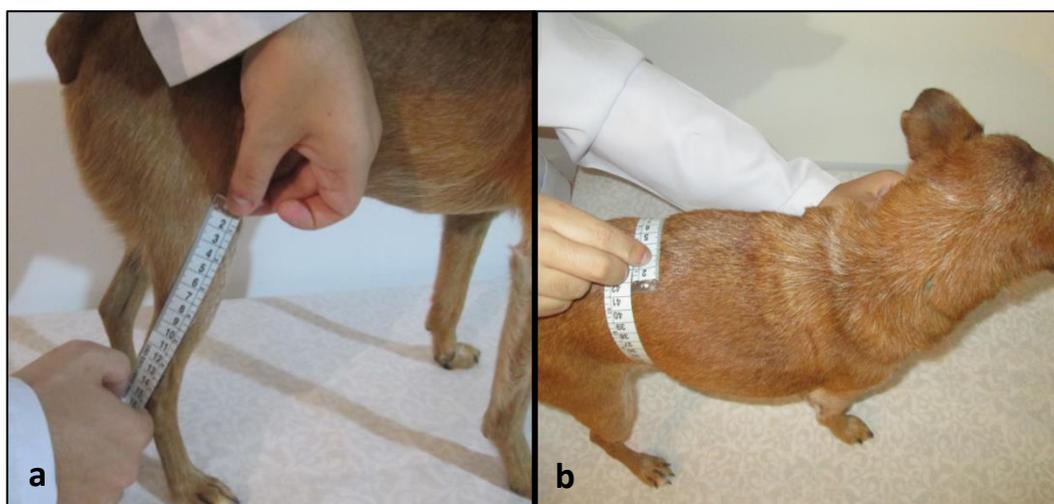


Figura 3 – Medidas morfométricas em sítios anatômicos distintos de cães. A medida entre a tuberosidade do calcâneo e o ligamento patelar médio corresponde ao comprimento do membro pélvico (a), enquanto o perímetro abdominal é determinado pela circunferência a partir do ponto médio entre a asa do íleo e última vértebra torácica (b).

Exame ecocardiográfico

O exame ecocardiográfico incluiu a avaliação em modo bidimensional, modo M e avaliações de Doppler espectral e colorido utilizando um equipamento ultrassonográfico (Esaote® MyLab™ 30 VET, Gênova, Itália) com transdutor multifrequencial (4-11 MHz). Todos os cães foram submetidos previamente à tricotomia da parede torácica, bilateralmente.

A velocidade do fluxo sanguíneo na valva mitral foi obtida através da avaliação com o estudo de Doppler pulsado e contínuo, em janela paraesternal esquerda e corte apical de quatro câmaras. A velocidade do fluxo mitral foi determinada após o alinhamento do cursor do Doppler na abertura dos folhetos valvares. As seguintes medidas foram adquiridas: pico de onda diastólica referente ao relaxamento ventricular pleno (onda E), pico de onda diastólica referente à contração atrial (onda A) e a sua razão (E/A). Em janela paraesternal esquerda em corte apical cinco câmaras foi delimitado o tempo entre o final do fluxo aórtico e início da onda E, caracterizando a medida do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e, posteriormente, a determinação da relação E/TRIV.

Os parâmetros avaliados pelo modo M foram obtidos a partir de imagens bidimensionais do eixo curto do coração, em janela parasternal direita, em plano cordal. Foram realizadas as seguintes medidas: septo interventricular em diástole (SIVd) e sístole (SIVs), diâmetro interno do ventrículo esquerdo durante a diástole (VEd) e sístole (VEs) e a espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (PLVEd) e sístole (PLVEs). Devido à variação destes parâmetros de acordo com o peso corporal de cada cão, foi estabelecida uma indexação de acordo com o diâmetro da aorta, obtendo os seguintes valores considerados para análise estatística: $SIVd_{Ao}$, VEd_{Ao} , $PLVEd_{Ao}$, $SIVs_{Ao}$, VEs_{Ao} , $PLVEs_{Ao}$. A fração de encurtamento (FS%) e da fração de ejeção (EF%) do ventrículo esquerdo foram calculados a partir de medições de VEd e VEs, utilizando o método de Teichholz. Os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta foram mensurados também em janela paraesternal direita, através de imagem bidimensional do eixo curto do coração, em nível aórtico, com medidas a partir da cúspide não coronariana da artéria aorta. Com a determinação destes valores, a relação átrio esquerdo:aorta (AE/Ao) foi calculada. Neste estudo, considerou-se valor de $AE/Ao > 1,37$ como indicativo de remodelamento atrial (PRADA et al., 2012).

O estudo de Doppler colorido em corte apical quatro câmaras foi realizado

com a finalidade de avaliar o sentido do fluxo sanguíneo nas valvas atrioventriculares. Nos casos de fluxo de regurgitação de sangue em valva mitral (V_{RM}) e tricúspide (V_{RT}), a velocidade máxima e o gradiente de pressão foram estimados.

Mensuração da pressão arterial sistêmica

A pressão arterial sistêmica (PAS) foi medida indiretamente utilizando um aparelho de Doppler vascular (MedMega DV 610, Franca-SP, Brasil), com os cães em decúbito lateral direito, sendo verificada através do fluxo da artéria digital dos membros torácicos. Uma vez que o manguito, que media aproximadamente 40% da circunferência do membro, era insuflado e o primeiro som do fluxo sanguíneo era percebido, a pressão sistólica era registrada. O valor final da PAS sistólica (PASs) foi estabelecido através da média de cinco mensurações consecutivas.

Hemograma e bioquímica sérica

Os cães foram submetidos à coleta de sangue venoso, sendo respeitado um período de restrição alimentar de 12 horas. As amostras foram armazenadas em tubos com e sem anticoagulante (EDTA), sendo encaminhadas para análise laboratorial. Utilizou-se o sangue total para realização do hemograma, enquanto o soro foi encaminhado para dosagem de albumina, alanina aminotransferase, colesterol, creatinina, fosfatase alcalina, glicose, triglicerídeos e ureia. Ainda, uma alíquota do soro foi separada e congelada a -20° C para dosagem de leptina. Os exames bioquímicos foram realizados por uma máquina automatizada (Mindray® BS-200, Shenzhen, China).

Os cães classificados como obesos também foram testados para hipotireoidismo. Para tal, foi coletado sangue para dosagem de T4 (tiroxina) livre, por quimioluminescência (Immulite 1000®, Siemens, Erlangen, Alemanha).

Dosagem de leptina sérica

Após a coleta de sangue e centrifugação, os soros foram armazenados e congelados a -20° C para posterior análise. A concentração de leptina sérica foi mensurada pelo método de imunoenensaio enzimático (ELISA) do tipo “sanduíche” através de teste comercial (Canine Leptin ELISA Kit EZCL-31K, Lot.# 2469194, Merck Millipore, Missouri, Estados Unidos), segundo recomendações do fabricante.

Efetou-se a leitura da placa em aparelho de espectrofotometria (Bio-Rad Model 550 Microplate Reader, Hercules, Califórnia, Estados Unidos), primeiramente em comprimento de onda de 450 nm e, na sequência, em 570 nm. A absorbância final das amostras foi calculada pela diferença da leitura entre os comprimentos de onda citados previamente. Para determinação da concentração de leptina, os dados de absorbância foram analisados em equação logística sigmoide de quatro parâmetros e o resultado final foi obtido pela média das amostras em duplicata (Anexos 1 e 2).

Análise estatística

Nos quatro grupos estudados foram realizadas medidas de tendência central e de dispersão dos valores referentes à leptina sérica, peso corporal, IMC, %GC, SIV_{AO}, VEd_{AO}, PLVEd_{AO}, SIV_{SAO}, VEs_{AO}, PLVEs_{AO}, EF%, FS%, AE/Ao, Onda E, Onda A, E/A, TRIV, E/TRIV, V_{RM} e V_{RT}. Realizou-se o teste de D'Agostino & Pearson para verificação da distribuição normal dos dados. Para comparação de valores entre os grupos analisados, foi realizada análise da variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Tukey para os dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn para os dados não paramétricos. Considerou-se diferença estatística quando $p < 0,05$. Ainda, foi realizada correlação de Pearson para os valores normais e correlação de Spearman para os dados em distribuição não-Gaussiana. Os testes estatísticos foram realizados através do *software* GraphPad Prism 5 (La Jolla, Califórnia, Estados Unidos).

2.5 RESULTADOS

O GOB foi formado por 18 cães (15 fêmeas e 3 machos): 7 sem raça definida, 4 poodle, 2 shih tzu, 2 lhasa apso, um pug, um cocker spaniel, um dachshund. Os animais apresentaram variação de peso corporal de 9,5 a 28,8 Kg, com idade média de 9,77 anos. O GOBCar incluiu 19 cães (13 fêmeas e 6 machos): 5 sem raça definida, 4 poodle, 3 lhasa apso, um dachshund, um schnauzer, um cocker spaniel, um shih tzu, um yorkshire terrier, um buldogue inglês e um pinscher. Estes cães obtiveram variação de peso corporal de 6,3 e 19,35 Kg, sendo a idade média de 11,7 anos. Dentre os cães deste grupo, todos apresentaram sopro cardíaco na avaliação física inicial. Foi verificado que 12 animais apresentavam insuficiência em

valvas mitral e tricúspide e 7 cães apresentam insuficiência somente em valva mitral. Também foram classificados de acordo com o estágio da doença cardíaca, sendo 10 em estágio B1, 3 em estágio B2 e 6 em estágio C. Já o GCar compreendeu 19 cães (6 fêmeas e 13 machos): 6 poodle, 3 sem raça definida, 3 dachshund, 2 lhasa apso, 2 schnauzer, 2 shih tzu e um yorkshire terrier. Tiveram variação de peso corporal de 4,1 e 11,7 Kg, sendo a idade média de 12,21 anos. Na avaliação física foi detectado sopro cardíaco em todos os cães deste grupo, sendo verificado pelo exame ecocardiográfico insuficiência de valvas mitral e tricúspide em 15 cães e insuficiência somente em valva mitral nos outros 4 animais. No que tange a classificação da doença cardíaca, 8 cães estavam em estágio B1, 3 cães e estágio B2 e 8 animais em estágio C. O GCon foi formado por 20 cães (14 fêmeas e 6 machos): 4 pinscher, 4 sem raça definida, 3 dachshund, 3 cocker spaniel, 2 poodle, um schnauzer, um yorkshire terrier, um lhasa apso e um beagle. Em relação ao peso corporal, tiveram variação de 4,3 e 10,5 Kg, com idade média de 10,95 anos.

Encontram-se na Tabela 1 as medidas referentes à média, seguidas do desvio padrão das mensurações da leptina sérica, do peso corporal em quilogramas, do IMC e da %GC dos animais pertencentes aos grupos estudados. Houve diferença entre a média da concentração de leptina sérica, IMC e %GC entre os grupos, sendo que os animais pertencentes aos grupos GOB e GOBCar obtiveram valores significativamente maiores quando comparados aos demais. Em relação ao peso corporal, o grupo GOB apresentou maior média, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos analisados.

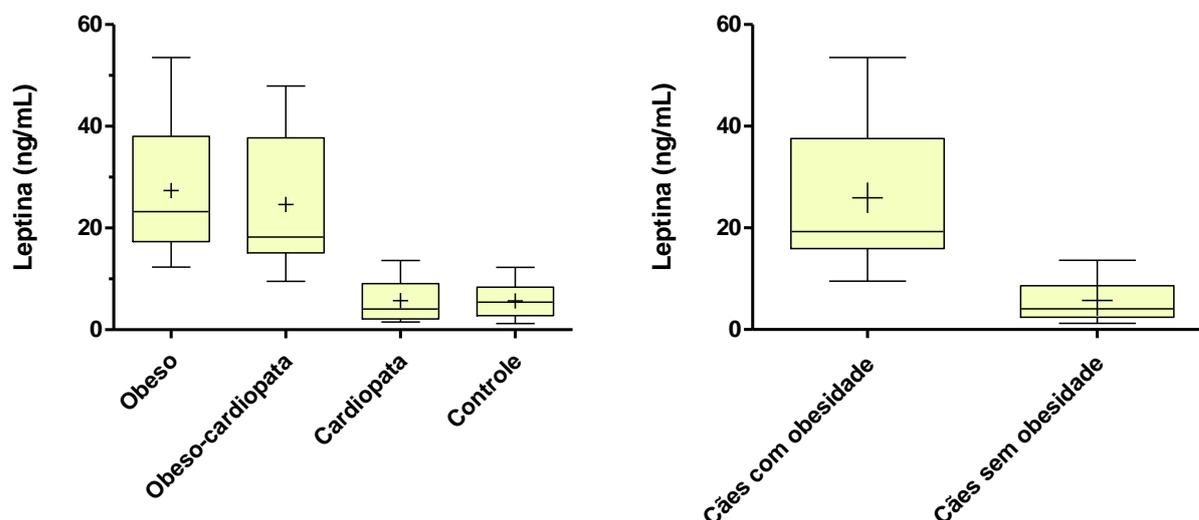
Tabela 1 – Resultados da média seguida do desvio padrão da dosagem da leptina sérica, do peso corporal, do IMC e da %GC em cães.

	Leptina sérica (ng/mL)	Peso (kg)	IMC	% GC
Obeso	27,35 ± 12,86 ^a	17,52 ± 5,25 ^a	28,80 ± 7,24 ^a	36,07 ± 4,74 ^a
Obeso-cardiopata	24,61 ± 12,14 ^a	14,23 ± 4,18 ^b	30,82 ± 12,33 ^a	34,01 ± 5,03 ^a
Cardiopata	5,72 ± 4,15 ^b	7,38 ± 2,28 ^c	15,77 ± 4,17 ^b	16,14 ± 4,69 ^b
Controle	5,69 ± 3,27 ^b	7,32 ± 1,90 ^c	15,95 ± 3,73 ^b	16,33 ± 3,40 ^b

O gráfico 1 demonstra os valores da média, mediana e valores mínimos e máximos da dosagem de leptina sérica em cada grupo analisado. Os cães pertencentes aos grupos GOB e GOBCar obtiveram valores significativamente maiores de leptina sérica quando comparados aos animais do grupo GCar e GCon.

Independente da condição cardíaca, também foi evidenciada diferença significativa dos valores séricos de leptina entre os cães com obesidade (GOB e GOBCar) e os cães com condição corporal normal (GCar e GCon).

Gráfico 1 – *Box plot* evidenciando valores de média (+), mediana (linha horizontal) e amplitude mínima e máxima dos valores séricos de leptina de cada grupo e em animais com e sem obesidade.



No que diz respeito aos valores séricos de leptina, o sexo do animal e a condição reprodutiva, não foi observada diferença estatística (ECC 4 e 5, $p=0,3749$; ECC 8 e 9, $p=0,1803$) entre machos e fêmeas, castrados ou inteiros (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de leptina sérica de acordo com o gênero e condição reprodutiva dos animais.

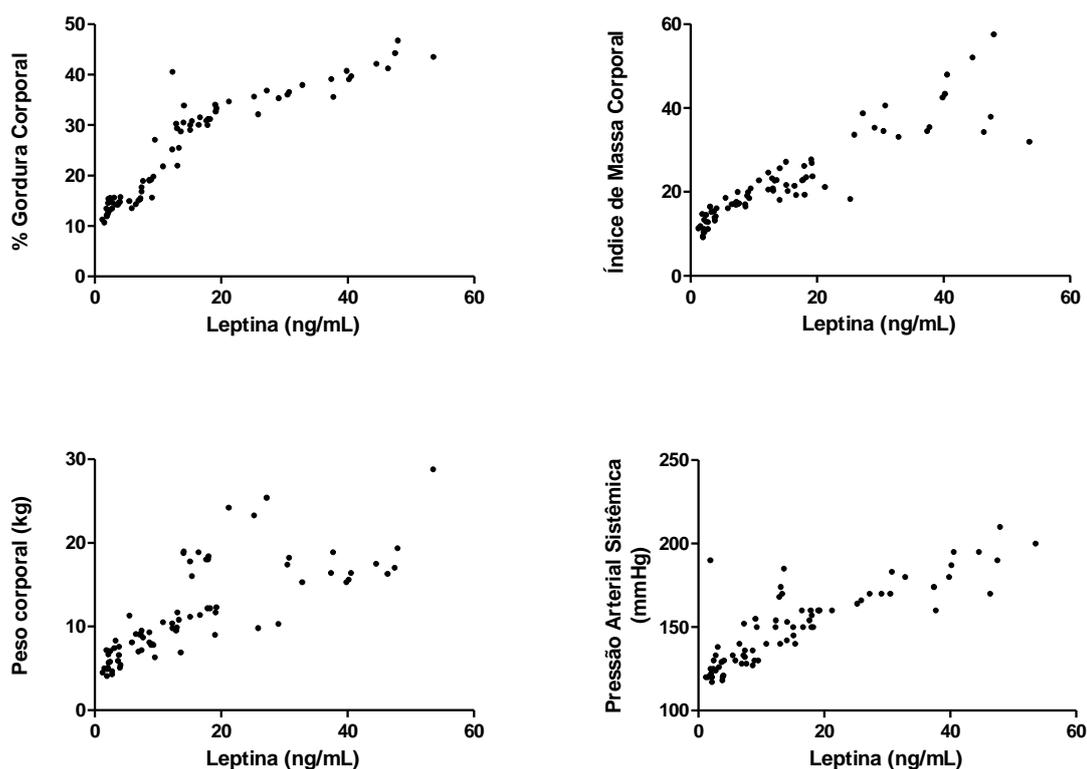
	n	Leptina sérica (ng/mL)	
		ECC	
		4 e 5	8 e 9
Fêmea inteira	11	$5,24 \pm 3,07^a$	$37,78 \pm 14,48^b$
Fêmea castrada	37	$6,31 \pm 4,31^a$	$24,11 \pm 11,77^b$
Macho inteiro	4	$8,03 \pm 4,16^a$	*
Macho castrado	24	$4,78 \pm 3,16^a$	$25,60 \pm 11,59^b$

* Não foi selecionado nenhum cão macho não castrado com ECC 8 ou 9.

Os cães dos grupos GOB e GOBCar apresentaram valores significativamente mais elevados de PAS (mmHg) em relação aos demais: GOB - $167,4 \pm 13,61^a$; GOBCar - $162,8 \pm 21,99^a$; GCar - $142,2 \pm 22,82^b$; GCon - $128,9 \pm 8,54^b$ ($p<0,0001$). Em análise individual de cada grupo, cerca de 88% (16/18), 63% (12/19) e 32% (6/19) dos animais dos grupos GOB, GOBCar e GCar, respectivamente, apresentaram valores de PAS superior a 150 mmHg, enquanto nenhum cão do GCon obteve este valor ou maior.

O gráfico 2 mostra as correlações entre os valores de leptina com os índices concernentes à condição corporal e a PAS do animal. Houve correlação positiva, significativa e alta entre a leptina e a %GC ($r = 0,963$), o IMC ($r = 0,9379$), o peso corporal ($r = 0,8645$) e a PAS ($r = 0,8493$).

Gráfico 2 – Correlação entre os níveis séricos de leptina e os valores referentes a %GC, IMC, peso corporal e PAS.



Na Tabela 3 estão identificados os resultados da média e do desvio padrão dos parâmetros ecocardiográficos avaliados em cada grupo. Houve diferença estatística significativa entre a média dos seguintes parâmetros: $SIV_{d_{A0}}$ ($p=0,0013$), $VE_{d_{A0}}$ ($p<0,0001$), $PLVE_{d_{A0}}$ ($p<0,0001$), $SIV_{s_{A0}}$ ($p<0,0001$), $PLVE_{s_{A0}}$ ($p=0,0005$), $EF\%$ ($p=0,0471$), $FS\%$ ($p=0,0486$), AE/A_0 ($p<0,0001$), onda E ($p=0,0004$), onda A ($p=0,0003$) e $E/TRIV$ ($p=0,0012$). Os cães do GObCar apresentaram valores significativamente maiores de $SIV_{d_{A0}}$, $EF\%$ e $FS\%$ quando comparados aos outros animais. A $VE_{d_{A0}}$, AE/A_0 , velocidade de onda E e de onda A, bem como a relação $E/TRIV$ foram significativamente maiores nos grupos GObCar e GCar. Os animais do grupo GCon apresentaram menores valores relacionados à $VE_{d_{A0}}$, $PLVE_{d_{A0}}$, $SIV_{s_{A0}}$ e $PLVE_{s_{A0}}$ quando comparados aos demais.

Tabela 3 – Resultado da média e desvio padrão dos parâmetros ecocardiográficos dos cães dos quatro grupos avaliados.

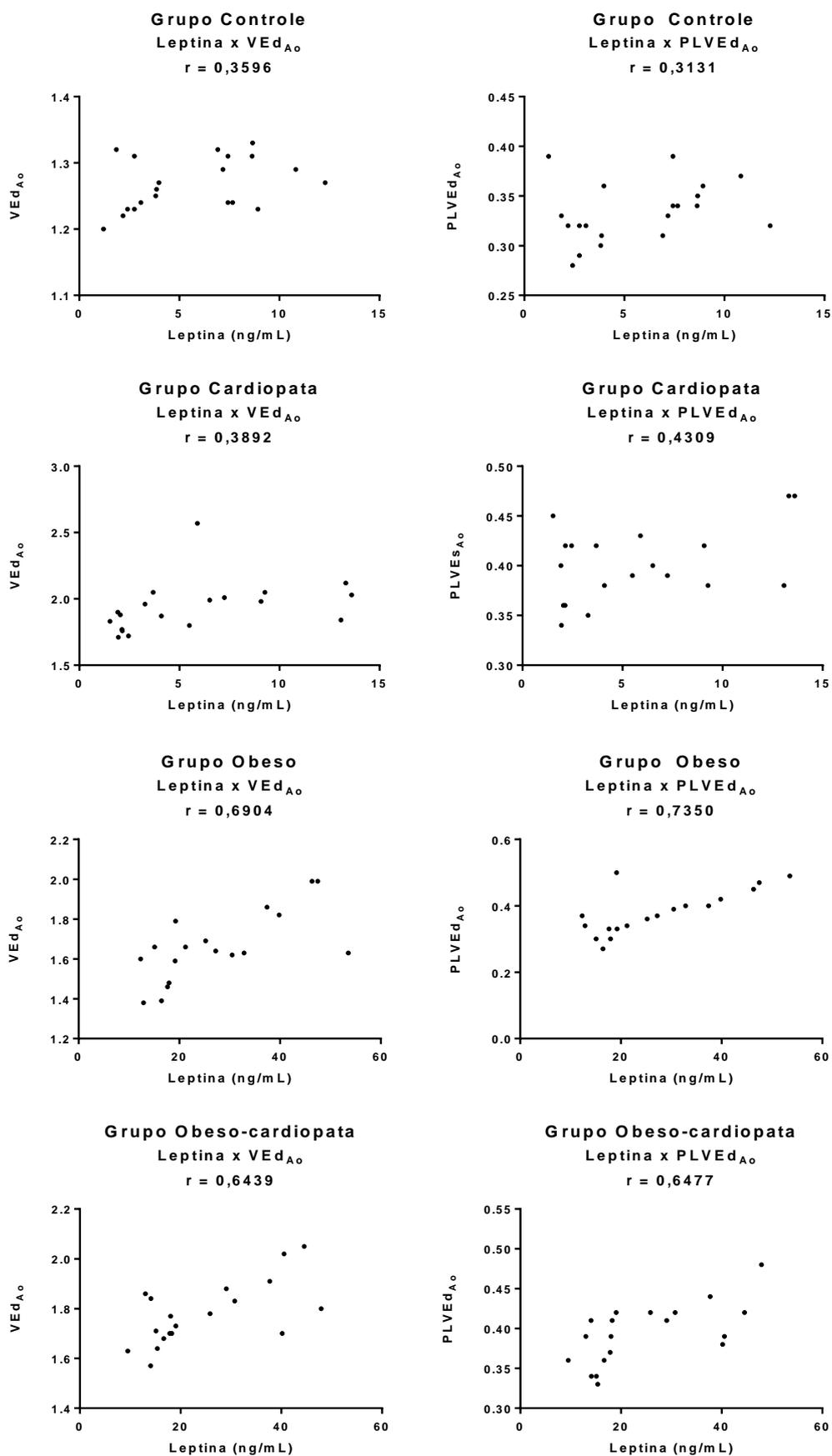
	Obeso	Obeso-cardiopata	Cardiopata	Controle
SIVd _{Ao}	0,41 ± 0,04 ^a	0,51 ± 0,14 ^b	0,41 ± 0,10 ^a	0,40 ± 0,06 ^a
VEd _{Ao}	1,68 ± 0,22 ^a	1,77 ± 0,18 ^{ab}	1,97 ± 0,28 ^b	1,28 ± 0,05 ^c
PLVEd _{Ao}	0,38 ± 0,07 ^a	0,39 ± 0,05 ^a	0,40 ± 0,05 ^a	0,33 ± 0,03 ^b
SIVs _{Ao}	0,66 ± 0,13 ^a	0,76 ± 0,15 ^a	0,72 ± 0,12 ^a	0,54 ± 0,09 ^b
VEs _{Ao}	0,93 ± 0,23 ^a	0,97 ± 0,28 ^a	1,09 ± 0,25 ^a	0,90 ± 0,16 ^a
PLVEs _{Ao}	0,68 ± 0,19 ^a	0,74 ± 0,18 ^a	0,69 ± 0,18 ^a	0,51 ± 0,10 ^b
EF%	78,28 ± 9,10 ^a	81,26 ± 8,86 ^{ab}	76,32 ± 7,75 ^a	73,55 ± 8,61 ^a
FS%	45,50 ± 7,62 ^a	49,95 ± 9,60 ^{ab}	44,21 ± 7,65 ^a	42,75 ± 7,83 ^a
AE/Ao	1,10 ± 0,10 ^a	1,35 ± 0,21 ^b	1,46 ± 0,34 ^b	1,10 ± 0,09 ^a
Onda E (cm/s)	73,84 ± 13,21 ^a	100,8 ± 40,41 ^{ab}	109,1 ± 45,00 ^b	71,43 ± 14,23 ^a
Onda A (cm/s)	69,34 ± 19,16 ^a	86,37 ± 16,41 ^b	84,03 ± 22,84 ^{ab}	63,56 ± 13,75 ^a
E/A	1,12 ± 0,29 ^a	1,17 ± 0,41 ^a	1,31 ± 0,45 ^a	1,15 ± 0,22 ^a
TRIV (ms)	53,83 ± 15,40 ^a	51,47 ± 15,54 ^a	44,05 ± 12,67 ^a	50,65 ± 15,36 ^a
E/TRIV	1,43 ± 0,34 ^a	2,33 ± 1,63 ^{ab}	2,96 ± 2,04 ^b	1,46 ± 0,35 ^a
V _{RM} (cm/s)	-	577,6 ± 45,92 ^a	586,0 ± 63,87 ^a	-
V _{RT} (cm/s)	-	302,1 ± 107,3 ^a	287,7 ± 93,51 ^a	-

SIVd_{Ao} e SIVs_{Ao}: septo interventricular em diástole e sístole, respectivamente, indexados ao diâmetro aórtico; VEd_{Ao} e VEs_{Ao}: cavidade do ventrículo esquerdo em diástole e sístole, respectivamente, indexados ao diâmetro aórtico; PLVEd_{Ao} e PLVEs_{Ao}: parede livre do ventrículo esquerdo em diástole e sístole, respectivamente, indexados ao diâmetro aórtico; EF%: fração de ejeção; FS%: fração de encurtamento; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; V_{RM}: velocidade do fluxo de regurgitação da valva mitral; V_{RT}: velocidade do fluxo de regurgitação da valva tricúspide.

Em análise individualizada, 10/18 (56%) cães do grupo GOB apresentaram elevados valores de VEd e 8/18 (44%) tiveram aumento nas medidas de PLVEd, indicando remodelamento ventricular excêntrico e concêntrico, respectivamente. Já no grupo GOBCar, 13/19 (68%) dos animais apresentavam valores aumentados de VEd e 11/19 (58%) de PLVEd. Ainda, 9/19 (47%) dos cães deste grupo obtiveram aumento da relação AE/Ao, indicando remodelamento atrial. Nos animais do grupo GCar, 10/19 (53%) tinham hipertrofia ventricular excêntrica, enquanto apenas 3/19 (16%) apresentaram hipertrofia ventricular concêntrica e 11/19 (58%) dos animais tinham a AE/Ao > 1,37. Os animais do grupo GCon obtiveram valores normais em relação às medidas do modo M e do diâmetro do átrio esquerdo.

Em relação à classificação da doença valvar crônica, não houve diferença estatística dos valores de leptina entre os animais em diferentes estágios (p=0,9249). Correlacionaram-se os níveis séricos de leptina com os parâmetros ecocardiográficos (Gráfico 3). Houve correlação significativa entre os valores de leptina e o VEd_{Ao} e a PLVE_{Ao} nos grupos de cães obesos (GOB e GOBCar).

Gráfico 3 – Correlação entre os níveis de leptina sérica e os parâmetros ecocardiográficos indexados ao diâmetro da aorta referentes ao diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (VEd_{Ao}) e a parede livre do ventrículo esquerdo em diástole ($PLVE_{Ao}$) em cães.



2.6 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram aumento na concentração sérica de leptina em cães com obesidade, independente da doença cardíaca, além de terem sido evidenciadas correlações significativas entre os níveis de leptina e os índices de avaliação da condição corporal, bem como associações entre os valores desta adipocina e a presença de hipertensão arterial sistêmica e hipertrofia cardíaca.

De forma majoritária, a identificação do sobrepeso e obesidade em cães se revela uma avaliação subjetiva. Sendo assim, a estimativa quantitativa da adiposidade se torna uma ferramenta essencial para o diagnóstico, prevenção e terapia desta condição. No presente trabalho foram estipulados 4 métodos de identificação da obesidade em cães: avaliação do ECC, cálculo do IMC e da %GC, bem como a dosagem da leptina. Após a descoberta desta adipocina e de sua relação com o gene *ob*, Maffei et al. (1995), determinaram os valores de leptina em roedores e humanos com obesidade e após a perda de peso. Verificou-se alta correlação positiva entre os valores de leptina e o IMC em ambas as espécies, nas duas fases do experimento. No estudo de Feitosa et al. (2007), os níveis de leptina tiveram correlação positiva com medidas antropométricas e dados de massa gorda obtida por bioimpedância em mulheres obesas. Já Gómez-Ambrosi et al. (2002), verificaram alta correlação positiva entre os valores de leptina e medidas de pletismografia por deslocamento de ar, também em pessoas com obesidade. Em cães, a leptina circulante está aumentada tanto na obesidade induzida experimentalmente, quanto em cães de estimação com maiores valores de ECC. Os estudos de Ishioka et al. (2007) e Park et al. (2014), concordam que valores de leptina plasmática são mais elevados quanto maior o ECC. Jeusette et al. (2005) induziram a condição de obesidade em cães através do fornecimento de alimentação hipercalórica até os animais atingirem a obesidade e verificaram níveis significativamente maiores do que em animais com condição corporal normal. Ainda, proporcionaram uma fase de perda de peso dos cães obesos, sendo verificado que os níveis de leptina reduziram após os animais atingirem condição corporal normal. O resultado do nosso estudo demonstra também valores significativamente elevados em animais obesos. Além de verificar alta correlação entre os níveis de leptina e o ECC em cães, Sagawa et al. (2002) efetuaram a análise da porcentagem de gordura corporal pelo método de diluição de deutério, resultando também em valores altamente correlacionados. Além de considerar o ECC, o nosso trabalho demonstrou

elevada correlação dos níveis séricos de leptina com o cálculo do IMC e da %GC, parâmetros que utilizam medidas morfométricas para sua determinação, o que sugere que a dosagem desta adipocina pode ser um marcador quantitativo de adiposidade também nos animais da espécie canina.

Embora a leptina seja secretada de forma contínua pelos adipócitos, sua concentração na circulação obedece ao ciclo circadiano. Ishioka et al. (2005) verificaram variações diurnas da concentração da leptina em cães em período pós-prandial, sendo os maiores valores encontrados em 5 a 8 horas após ingestão de alimento. Tais variações diurnas desapareceram quando os cães foram mantidos em restrição alimentar. No nosso estudo, anteriormente à coleta das amostras biológicas, todos os cães foram submetidos a jejum alimentar de no mínimo 12 horas e a coleta foi efetuada no período matutino. A transcrição do gene *ob* e secreção de leptina também são comprovadamente influenciadas por vários mediadores metabólicos e inflamatórios, incluindo a insulina, glicocorticoides e citocinas (JANECKOVÁ, 2001; MANTZOROS et al., 2011). Como forma de evitar variações na concentração de leptina que não fossem relacionadas à sua fisiologia, no nosso estudo não foram selecionados animais com suspeita ou confirmação de doenças endócrinas (hipotireoidismo e diabetes mellitus), metabólicas e inflamatórias.

Os efeitos do gênero e do estado reprodutivo dos animais foram analisados através da comparação dos valores séricos de leptina entre machos e fêmeas e de cães castrados ou não. Verificou-se que não houve diferença entre machos e fêmeas, castrados ou não, tanto em animais obesos quanto em cães com condição corporal normal. Estes resultados parecem ser consistentes com os estudos de Ishioka et al. (2007), que também verificaram que concentrações de leptina no plasma não foram diferentes entre cães machos e fêmeas, independentemente de seu ECC. Além disso, Sagawa et al. (2002), verificaram que o nível plasmático de leptina não se alterou em beagles do sexo feminino após ovariectomia, demonstrando a não influência da condição reprodutiva nos valores desta adipocina. Entretanto, em humanos e ratos tem sido relatado que as concentrações de leptina no plasma são mais elevadas nas fêmeas do que machos, dependendo da quantidade de leptina segregada a partir da placenta e glândula mamária (OSTLUND et al., 1996; MASUZAKI et al., 1997). Diferentemente do que ocorre nos animais destas espécies, a expressão do gene *ob* em cães parece estar confinada

estritamente ao tecido adiposo branco (EISELE et al., 2005; RADIN et al., 2009). Sendo assim, estudos relacionando os níveis de leptina com hormônios sexuais, sobretudo em cadelas prenhes, são necessários para esclarecer esta questão.

A obesidade aumenta a morbidade e mortalidade cardiovascular, em parte, ao induzir um quadro de hipertensão sistêmica (KSHATRIYA et al., 2010; RAHMOUNI, 2010). Neste trabalho, animais obesos apresentaram valores de PAS significativamente mais elevados quando comparados a animais com condição corporal normal, independente da presença de cardiopatia valvar. Também foi observada correlação significativa dos níveis de leptina com a PAS, o que sugere a participação desta adipocina na regulação da pressão arterial, sobretudo em pacientes obesos. Em humanos, a fisiopatologia da hipertensão associada à obesidade é multifatorial e a leptina desempenha importantes ações que culminam na elevação da PAS (BELTOWSKI, 2006). Tanida et al. (2000) verificaram ativação renal exacerbada do sistema nervoso simpático (SNS) em ratos submetidos a aplicação de leptina em tecido perirenal, sugerindo que esta adipocina pode ter ação local ao estimular fibras aferentes de maneira parácrina. Já Satoh et al. (1999) investigaram o efeito da leptina sobre as catecolaminas em modelos de roedores e observaram um aumento significativo na concentração plasmática de adrenalina após administração de leptina. Além disso, em um estudo *in vitro* de Quehenberger et al. (2002), a leptina foi associada à produção de endotelina-1, substância mediadora do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), sugerindo regulação sinérgica entre estas duas proteínas. De uma forma geral, o estado de hiperleptinemia crônica em indivíduos obesos conduz a um quadro de desbalanço no sistema neuro-hormonal, proporcionando acentuação da atividade simpática renal, bem como aumento da síntese de catecolaminas, o que culmina em ativação do SRAA, vasoconstrição periférica e retenção de sódio (MALMQVIST et al., 2002). Além de ter ação direta na ativação do SNS e na produção de catecolaminas, a leptina possui ação sobre substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio, sobretudo o óxido nítrico (NO). Em sua essência, o NO desempenha grande importância no controle cardiovascular, tanto na resistência vascular periférica como na agregação plaquetária, atuando como um fator relaxante que promove vasodilatação (KSHATRIYA et al., 2010). Estudos experimentais em ratos verificaram que a leptina estimula a produção sistêmica de NO, sugerindo, controversamente, que o hormônio também participa de mecanismos hipotensivos,

mesmo ativando e estimulando o SNS (BELTOWSKI et al., 2002). Entretanto, em indivíduos obesos ocorre um desequilíbrio entre os seus efeitos pressores e depressores, sendo necessários mais estudos que caracterizem os mecanismos diretos e indiretos da leptina sobre os sistemas hormonais que regulam a PAS em cães.

Nesta pesquisa foi demonstrado que a condição de obesidade em cães, independente da presença de doença cardíaca, está relacionada ao remodelamento ventricular. Foi verificado tanto hipertrofia ventricular esquerda concêntrica (aumento de $PLVE_{A_0}$ e/ou SIV_{A_0}), quanto excêntrica (aumento do $VE_{d_{A_0}}$) em grande parte dos cães do grupo GOB. O fato de termos verificado vários cães obesos com hipertrofia ventricular concêntrica concorda com os dados da pesquisa de Mehlman et al. (2013), que encontraram evidências ecocardiográficas e *post mortem* de aumento da parede livre do ventrículo em cães com obesidade. As características de remodelamento ventricular concêntrico assimétrico se assemelham ao encontrado em humanos obesos não hipertensos. Possivelmente, a severidade e a duração da obesidade, bem como seus efeitos pró-inflamatórios crônicos e o tipo de dieta fornecida contribuem para o desenvolvimento desta condição (SHARMA et al., 2007; JECKEL et al., 2011; RIDER et al., 2011). Neste trabalho, também deve ser considerado que vários animais com obesidade detinham condição de hipertensão sistêmica, o que gera sobrecarga de pressão em ventrículo esquerdo, também proporcionando espessamento do septo interventricular e/ou da parede livre do ventrículo esquerdo. Estudos futuros com cães obesos normotensos devem ser realizados a fim de verificar se esta condição pode estar associada ao desenvolvimento da hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo de forma conjunta à obesidade. Já a hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo, também verificada nos animais obesos deste trabalho, está de acordo com a suposição geral de que a obesidade está associada a um aumento da massa corporal, produzindo maior volume plasmático e conseqüentemente levando a um maior débito cardíaco. Estas alterações hemodinâmicas culminam em sobrecarga ventricular esquerda, resultando em dilatação da câmara ventricular, normalmente de forma discreta, além de estar associada à diminuição do colágeno e degeneração de cardiomiócitos (ZHENG et al., 2009; CUSPIDI et al., 2014).

No que tange os níveis circulantes de leptina e os parâmetros ecocardiográficos, verificou-se importante relação da leptina com a $PLVE_{d_{A_0}}$ e $VE_{d_{A_0}}$

nos cães obesos (GOB e GOBCar), o que está associado a hipertrofia concêntrica e excêntrica. O efeito hipertrófico da leptina é associado a numerosos processos de sinalização celular, alguns dos quais atuam em conjunto para modificar a regulação da transcrição que resultando no fenótipo hipertrófico (SWEENEY, 2010). Diversos estudos têm relacionado a leptina como um agente que promove indiretamente a hipertrofia do coração (KARMAZYN & RAJAPUROHITAM, 2014). Em condições *in vivo*, as ações cardiovasculares da leptina promovem um efeito estimulador simpático central, resultando em consequências dependentes do SNS, tal como a elevação da pressão sanguínea e efeitos inotrópico e cronotrópico positivos. No entanto, a hiperleptinemia crônica pode exercer ações diretas no coração e no endotélio vascular através de mecanismos de sinalização celular dependentes de Ob-R. De forma contrária à ação sobre a estimulação do SNS, Nickola et al. (2000) verificaram que a leptina proporcionou um efeito inotrópico negativo, por induzir a produção de NO em miócitos ventriculares murinos isolados. O inotropismo negativo também está relacionado à sinalização intracelular, através ativação do sistema de transdução de sinal pela proteína Janus quinase (JAK2-STAT3), desencadeando uma cascata de reações que culminaram na transcrição de genes promotores da hipertrofia cardíaca (WOLD et al., 2002). Não foi verificado aumento nas frações de ejeção e encurtamento assim como taquicardia em cães deste trabalho. Abe et al. (2007) também estudaram a hipertrofia cardíaca causada pela leptina e constataram sinais de alongamento do cardiomiócito, mediada também pela ativação do sistema JAK2-STAT3. Por sua vez, Rajapurohitam et al. (2003) evidenciaram a hipertrofia cardíaca após administração de leptina em cobaias murinas, caracterizando um aumento no volume dos cardiomiócitos, aumento da síntese proteica tecidual e regulação positiva e elevada nos marcadores genéticos de hipertrofia cardíaca. Já foi definido que a leptina participa de outros mecanismos estimulantes da hipertrofia, como a ativação de proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), bem como a estimulação por parte de Rho-quinases (RhoA/ROCK), ambas culminando em alterações na dinâmica da actina (ZEIDAN et al., 2006). Outra ação que culmina em hipertrofia cardíaca proporcionada pela leptina é relacionada à mudanças na estrutura da matriz extracelular (MEC) do miocárdio (SWEENEY, 2010). A MEC e o metabolismo das fibras colágenas são regulados por metaloproteinases (MMP). Em estudo *in vitro* com cardiomiócitos murinos foi verificado que a administração dose dependente de leptina aumentou a atividade de MMP-2 por sinalização intracelular

de MAPK (SCHRAM et al., 2010). Apesar de verificar sinais de hipertrofia ventricular excêntrica e concêntrica em cães obesos e de observar correlação entre os valores elevados de leptina e o tamanho da câmara e espessura da parede ventricular esquerda, os índices que avaliam a função sistólica e diastólica estavam preservados nos cães deste trabalho. Os efeitos deletérios da leptina e da obesidade sobre o sistema cardiovascular possivelmente estão relacionados à severidade e cronicidade em que esta condição se instala, sendo necessários estudos longitudinais com cães com obesidade crônica para acompanhar esta relação.

Outras alterações de parâmetros ecocardiográficos que encontramos neste estudo foram em relação à velocidade da onda E e à relação E/TRIV, que são índices relacionados à predição do desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (SCHOBER et al., 2010). Verificamos valores significativamente mais elevados destes parâmetros ecocardiográficos nos animais dos grupos GCar e GOBCar. Nestes grupos foram incluídos cães em diferentes estágios de doença cardíaca, inclusive animais em estágio C, o que culminou em maior média da velocidade da onda E e da relação E/TRIV. Determinou-se assim que, apesar de participar de processos de remodelamento cardíaco, a obesidade *per se* não está envolvida nestes índices de desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva.

Em pessoas, foi determinado que o aumento das concentrações sanguíneas de leptina correlaciona-se com a classe de insuficiência cardíaca, além de possuir valor prognóstico (SCHULZE et al., 2003). Fonfara et al. (2011) verificaram correlação entre altas concentrações de leptina expressa no miocárdio de cães e estágios avançados da doença cardíaca, inclusive em refratariedade terapêutica. A associação entre a concentração sérica de leptina canina com as distintas classificações da insuficiência cardíaca não foi encontrada neste estudo, possivelmente, pela seleção de grande parte de animais com doença cardíaca inicial, ainda compensada. Por conseguinte, o papel da leptina como um marcador de prognóstico em cães com doença cardíaca ainda não é conhecido e necessita de mais investigação.

Um grande desafio para pesquisas futuras é compreender como as adipocinas interagem entre si e de forma sistêmica, modificando a estrutura e função cardíaca. Esta vem a ser uma interessante área de estudo, não só no que diz respeito à obesidade, mas também em relação ao papel do tecido adiposo como

órgão endócrino que regula a função cardíaca tanto de forma fisiológica quanto na presença de cardiopatias.

2.7 CONCLUSÃO

Desde sua descoberta inicial há pouco mais de 20 anos, o conhecimento sobre as ações biológicas da leptina tem se expandido de forma substancial. Embora listada como um fator conexo à saciedade alimentar e à homeostase de energia, a leptina pode estar envolvida no desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica e hipertrofia miocárdica, sendo um elo biológico fundamental entre a obesidade e distúrbios cardiovasculares também em cães.

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; ONO, K.; KAWAMURA, T.; WADA, H.; KITA, T.; SHIMATSU, A.; HASEGAWA, K. Leptin induces elongation of cardiac myocytes and causes eccentric left ventricular dilatation with compensation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2007; 292(5):H2387-2396.

ABEL, E. D.; SWEENEY, G. Modulation of the cardiovascular system by leptin. **Biochimie**, 2012; 94, 2097–2103.

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J. P.; BOTOLUZZI, M. N.; MOIZO, L.; LEHY, T.; GUERRE-MILLO, M.; MARCHAND-BRUSTEL, Y. L.; LEWIN, M. J. M. The stomach is a source of leptin. **Nature**, 1998; 394(6695):790-793.

BELTOWSKI, J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. **J Hypertens**, 2006; 24:789–801.

BELTOWSKI, J.; WÓKCICKA, G.; BORKOWSKA, E. Human leptin stimulates systemic nitric oxide production in the rat. **Obes Res**, 2002; 10(9):939-946.

BOBBERT, P.; JENKE, A.; BOBBERT, T.; KUHL, U.; RAUSCH, U.; LASSNER, D.; SCHEIBENBOGEN, C.; POLLER, W.; SCHULTHEISS, H. P.; SKURK, C. High leptin and resistin expression in chronic heart failure: adverse outcome in patients with dilated and inflammatory cardiomyopathy. **Eur J Heart Fail**, 2012; 14:1265–1275.

BURKHOLDER, W. J.; TOLL, P. W. Obesity. In: HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L. **Small Animal Clinical Nutrition**. 4th ed. Topeka: Mark Morris Institute, 2000:401-430.

CORREIA, M. L. G.; HAYNES, W. G. Leptin, obesity and cardiovascular disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 2004; 13:215–223.

CUSPIDI, C.; RESCALDANI, M.; SALA, C.; GRASSI, G. Left-ventricular hypertrophy and obesity: a systematic review and meta-analysis of echocardiographic studies. **J Hypertens**, 2014; 32(1):16-25.

EISELE, I.; WOOD, I. S.; GERMAN, A. J.; HUNTER, L.; TRAYHURN, P. Adipokine gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture. **Horm Metab Res**, 2005; 37(8):474-481.

ENRIORI, P. J.; EVANS, A. E.; SINNAYAH, P.; COWLEY, M. A. Leptin resistance and obesity. **Obesity (Suppl)**, 2006; 14, 254S-258S.

FEITOSA, A. C. R.; MANCINI, M. C.; CERCATO, C.; VILLARES, S. M.; HALPERN, A. Relação entre o perfil metabólico e níveis de leptina em indivíduos obesos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 2007; 51(1):59-64.

FONFARA, S.; HETZEL, U.; TEW, S. R.; DUKES-MCEWAN, J.; CRIPPS, P.; CLEGG, P. D. Leptin expression in dogs with cardiac disease and congestive heart failure. **J Vet Intern Med**, 2011; 25:1017-1024.

GÓMEZ-AMBROSI, J.; SALVADOR, J.; PÁRAMO, J. A.; ORBE, J.; IRALA, J.; DIEZ-CABALLERO, A.; GIL, M. J.; CIENFUEGOS, J. A.; FRUHBECK, G. Involvement of leptin in the association between percentage of body fat and cardiovascular risk factors. **Clin Biochem**, 2002; 35(4):315-320.

HARRIS, R. B. S. Leptin - Much more than a satiety signal. **Annu Rev Nutr**, 2000; 20:45-75.

HOGGARD, N.; HUNTER, L.; DUNCAN, J. S.; WILLIAMS, L. M.; TRAYHURN, P.; MERCER, J. G. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1997; 94(20):11073-11078.

HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Domest Anim Endocrinol**, 1998; 15(6):457-475.

ISHIOKA, K.; HATAI, H.; KOMABAYASHI, K.; SOLIMAN, M. M.; SHIBATA, H.; HONJOH, T.; KIMURA, K.; SAITO, M. Diurnal variations of serum leptin in dogs: effects of fasting and re-feeding. **Vet J**, 2005; 169(1):85-90.

ISHIOKA, K.; HOSOYA, K.; KITAGAWA, H.; SHIBATA, H.; HONJOH, T.; KIMURA, K.; SAITO, M. Plasma leptin concentration in dogs: Effects of body condition score, age, gender and breeds. **Res Vet Sci**, 2007; 82:11-15.

JANECKOVÁ, R. The Role of Leptin in Human Physiology and Pathophysiology. **Physiol Res**, 2001; 50:443-459.

JECKEL, K. M.; MILLER, K. E.; CHICCO, A. J.; CHAPMAN, P. L.; MULLIGAN, C. M.; FALCONE, P. H.; MILLER, M. L.; PAGLIASSOTTI, M. J.; FRYE, M. A. The role of dietary fatty acids in predicting myocardial structure in fat-fed rats. **Lipids Health Dis**, 2011; 10:92.

JEUSETTE, I. C.; DETILLEUX, J.; SHIBATA, H.; SAITO, M.; HONJOH, T.; DELOBEL, A.; ISTASSE, L.; DIEZ, M. Effects of chronic obesity and weight loss on plasma ghrelin and leptin concentrations in dogs. **Res Vet Sci**, 2005; 79:169-175.

KARMAZYN, M.; RAJAPUROHITAM, V. Leptin as a cardiac pro-hypertrophic factor and its potential role in the development of heart failure. **Curr Pharm Des**, 2014; 20:646-651.

KSHATRIYA, S.; REAMS, G. P.; SPEAR, R. M.; FREEMAN, R. H.; DIETZ, J. R.; VILLAREAL, D. Obesity hypertension - The emerging role of leptin in renal and cardiovascular dyshomeostasis. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 2010; 19(1):72-78.

LEAL, V. O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clin Chim Acta**, 2013; 419, 87–94.

LAFLAMME, D. P. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. **Canine Practice**, 1997; 22:10–15.

MADEJ, T.; BOGUSKI, M. S.; BRYANT, S. H. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. **FEBS Lett**. 1995; 373(1):13-8.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R. E.; LEE, G. H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S.; KERN, P. A.; FRIEDMAN, J. M. Leptin level in human and rodent: Measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature Medicine**, 1995; 1(11); 1155-1161.

MALMQVIST, K.; OHMAN, K. P.; LIND, L.; NYSTROM, F.; KAHAN, T. Relationships between left ventricular mass and the renin-angiotensin system, catecholamines, insulin and leptin. **J Intern Med**, 2002; 252(5):430-439.

MANTZOROS, C. S.; MAGKOS, F.; BRINKOETTER, M.; SIENKIEWICZ, E.; DARDENO, T. N.; KIM, S. Y.; HAMNVIK, O. P. R.; KONIARIS, A. Leptin in human physiology. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2011; 301:E567–E584.

MARTIN, S. S.; QASIM, A.; REILLY, M. P. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. **J Am Coll Cardiol**, 2008; 52(15):1201-1210.

MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; SAGAWA, N.; HOSODA, K.; MATSUMOTO, T.; MISE, H.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y. TANAKA, I.; MORI, T.; NAKAO, K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nat Med**, 1997; 3(9):1029-1033.

MUELLER, D. C. M.; SCHOSSLER, J. E.; PINHEIRO, M. Adaptação do índice de massa corporal humano para cães. **Ciência Rural**, 2008; v.38, n.4, 1038-1043.

NEGRÃO, A. B.; LICINIO, J. Leptina - O diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 2000;443; 205-14.

OSTLUND, R. E.; YANG, J. W.; KLEIN, S.; GINGERICH, R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. **J Clin Endocrinol Metab**, 1996; 81(11):3909-3913.

PARK, H. J.; LEE, S. E.; OH, J. H.; SEO, K. W.; SONG, K. H. Leptin, adiponectin and serotonin levels in lean and obese dogs. **BMC Vet Res**, 2014; 10(113):1-8.

PRADA, D. G.; OLIVEIRA, V. M. C.; LARSSON, M. H. M. A.; YAMAKI, F. L. Avaliação ecocardiográfica do átrio esquerdo de cães saudáveis por meio do modo-M convencional e do modo bidimensional. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.64, n.3, p.585-592, 2012.

QUEHENBERGER, P.; EXNER, M.; SUNDER-PLOSSMANN, R.; RUZICKA, K.; BIEGLMAYER, C.; ENDLER, G.; MUELLNER, C.; SPEISER, W.; WAGNER, O. Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. **Circ Res**, 2002; 90(6):711-718.

RADIN, M. J.; SHARKEY, L. C.; HOLYCROSS, B. J. Adipokines - a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. **Vet Clin Pathol**, 2009, 382; 136–156.

RAHMOUNI, K. Leptin-induced sympathetic nerve activation - signaling mechanisms and cardiovascular consequences in obesity. **Curr Hypertens Rev**, 2010; 6(2) 104–209.

RAJAPUROHITAM, V.; GAN, X. T.; KIRSHENBAUM, L. A.; KARMAZYN, M. The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. **Circ Res**, 2003; 93(4):277-279.

REN, J.; ZHU, B. H.; RELLING, D. P.; ESBERG, L. B.; CEYLAN-ISIK, A. F. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. **Obesity**, 2008; 16:2417-2423.

RIDER, O. J.; PETERSEN, S. E.; FRANCIS, J. M.; ALI, M. K.; HUDSMITH, L. E.; ROBINSON, M. R.; CLARKE, K.; NEUBAUER, S. Ventricular hypertrophy and cavity dilatation in relation to body mass index in women with uncomplicated obesity. **Heart**, 2011; 97(3):203-208.

SAGAWA, M. M.; NAKADOMO, F.; HONJOH, T.; ISHIOKA, K.; SAITO, M. Correlation between plasma leptin concentration and body fat content in dogs. **Am J Vet Res**, 2002;63(1):7-10.

SATOH, N.; OGAWA, Y.; KATSUURA, G.; NUMATA, Y.; TSUJI, T.; HAYASE, M.; EBIHARA, K.; MASUZAKI, H.; HOSODA, K.; YOSHIMASA, Y.; NAKAO, K. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. **Diabetes**, 1999; 48(9):1787-1793.

SCHOBER, K. E.; HART, T. M.; STERN, J. A.; LI, X.; SAMII, V. F.; ZEKAS, L. J.; SCANSEN, B. A.; BONAGURA, J. D. Detection of congestive heart failure in dogs by Doppler echocardiography. **J Vet Intern Med**, 2010; 24(6):1358-1368.

SCHRAM, K.; DE GIROLAMO, S.; MADANI, S.; MUNOZ, D.; THONG, F.; SWEENEY, G. Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes. **Cell Mol Biol Lett**, 2010; 15(4):551-563.

SCHULZE, P. C.; KRATZSCH, J.; LINKE, A.; SCHOENE, N.; ADAMS, V.; GIELEN, S.; ERBS, S.; MOEBIUS-WINKLER, S.; SCHULER, G. Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. **Eur J Heart Fail**, 2003; 5(1):33-40.

SENARIS, R.; GARCIA-CABALLERO, T.; CASABIELL, X.; GALLEGRO, R.; CASTRO, R.; CONSIDINE, R. V.; DIEQUEZ, C.; CASANUEVA, F. F. Synthesis of leptin in human placenta. **Endocrinology**, 1997; 138(10):4501-4504.

SHARMA, N.; OKERE, I. C.; DUDA, M. K.; JOHNSON, J.; YUAN, C. L.; CHANDLER, M. P.; ERNSBERGER, P.; HOIT, B. D.; STANLEY, W. C. High fructose diet increases mortality in hypertensive rats compared to a complex carbohydrate or high fat diet. **Am J Hypertens**, 2007; 20(4):403-409.

SINGH, M.; BEDI, U. S.; SINGH, P. P.; ARORA, R.; KHOSLA, S. Leptin and the clinical cardiovascular risk. **Int J Cardiol**, 2010; 140, 266-271.

SMITH-KIRWIN, S. M.; O'CONNOR, D.; JOHNSTON, J.; LANCEY, E. D.; HASSINK, S. G.; FUNANAGE, V. L. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. **J Clin Endocrinol Metab**, 1998; 83(5):1810-1813.

SWEENEY, G. Cardiovascular effects of leptin. **Nat Rev Cardiol**, 2010; 7:22-29.

TANIDA, M.; IWASHITA, S.; OOTSUKA, Y.; TERUI, N.; SUZUKI, M. Leptin injection into white adipose tissue elevates renal sympathetic nerve activity dose-dependently through the afferent nerves pathway in rats. **Neurosci Lett**, 2000;293(2):107-110.

YANG, R.; BAROUCH, L. A. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. **Circ Res**, 2007; 101:545-559.

WANG, J.; LIU, R.; HAWKINS, M.; BARZILAI, N.; ROSSETTI, L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature**, 1998; 393(6686):684-688.

WOLD, L. E.; RELLING, D. P.; DUAN, J.; NORBY, F. L.; REN, J. Abrogated leptin induced cardiac contractile response in ventricular myocytes under spontaneous hypertension: role of JAK/STAT pathway. **Hypertens**, 2002; 39 (1):69-74.

ZEIDAN, A.; JAVADOV, S.; KARMAZYN, M. Essential role of Rho/ROCK-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes. **Cardiovasc Res**, 2006; 72(1):101-111.

ZHENG, J.; CHEN, Y.; PAT, B.; DELL'ITALIA, L. A.; TILLSON, M.; DILLON, A. R.; POWELL, P. C.; SHI, K.; SHAH, N.; DENNEY, T.; HUSAIN, A.; DELL'ITALIA, L. J. Microarray identifies extensive downregulation of noncollagen extracellular matrix

and profibrotic growth factor genes in chronic isolated mitral regurgitation in the dog. **Circulation**, 2009; 119(15):2086-2095.

ZORAN, D. L. Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. **Vet Clin Small Anim**, 2010; 40:221–239.

3 DETERMINAÇÃO DA DISPERSÃO DA ONDA P EM CÃES OBESOS

Determination of P wave dispersion in obese dogs

3.1 RESUMO

A dispersão da onda P (P_d) é um índice eletrocardiográfico definido como a diferença entre a duração mínima e máxima da onda P em múltiplas derivações. O prolongamento da P_d reflete a despolarização atrial descontínua e não homogênea, sendo resultado de doenças cardíacas e não cardíacas. Em humanos, a elevação da P_d está envolvida no desenvolvimento de arritmias cardíacas, sobretudo a fibrilação atrial (FA). O objetivo deste trabalho foi determinar o valor da P_d em cães com obesidade. Foram selecionados 76 cães, classificados de acordo com a condição corporal e presença de cardiopatia: obesos (grupo I), obesos com cardiopatia valvar (grupo II), cães com cardiopatia valvar (grupo III) e animais saudáveis (grupo IV). Os cães foram submetidos ao exame eletrocardiográfico em 6 derivações para o cálculo da P_d , bem como ecocardiografia para verificação da presença de cardiopatia e determinação da relação átrio esquerdo/aorta (AE/Ao). Foram verificados valores de P_d significativamente maiores em cães dos grupos I, II e III ($18,0 \pm 7,6$ ms; $16,1 \pm 4,4$ ms; $12,1 \pm 4,3$ ms) quando comparados ao grupo IV ($7,3 \pm 2,2$ ms). Houve correlação significativa entre a P_d e o índice de massa corporal bem como com a porcentagem de gordura nos cães com obesidade. Não foi verificada associação entre os valores da P_d e AE/Ao. Sendo assim, evidenciamos que cães obesos, independente da presença de cardiopatia valvar concomitante, apresentaram elevados valores de P_d , o que sugere propagação desordenada do impulso elétrico atrial. Estudos eletrofisiológicos em cães com esta condição são estimulados para melhor entendimento da associação entre esse índice e a FA.

Palavras chave: duração da onda P, índices da onda P, fibrilação atrial, arritmia.

3.2 ABSTRACT

P-wave dispersion (P_d) is an electrocardiographic index defined as the difference between the minimum and maximum P-wave duration in multiple leads. The elevation of P_d reflects the discontinuous and inhomogeneous atrial depolarization resulted from cardiac and non-cardiac conditions. In humans, elevated P_d is involved in the development of cardiac arrhythmias, particularly atrial fibrillation (AF). Our study aims at determining the P_d in obese dogs. Seventy six dogs were selected and classified according to body condition and presence of chronic valvular disease (CVD): obese dogs (group I), dogs with both obesity and CVD (group II), dogs with CVD (group III) and healthy animals (group IV). Six-lead electrocardiography was performed to determine P_d , while echocardiography evaluated the presence of cardiac disease and determined left atrial to and aortic root ratio (LA/Ao). We have found significantly higher P_d values in dogs of groups I, II and III (18.0 ± 7.6 ms, 16.1 ± 4.4 ms, 12.1 ± 4.3 ms) when compared to group IV (7.3 ± 2.2 ms). There was a significant correlation between P_d and body mass index as well as the percentage of body fat in obese dogs. There was no association between the values of P_d and LA/Ao. Thus, we have demonstrated that obese dogs, regardless of the presence of concomitant CVD, presented high P_d values, suggesting uncontrolled propagation of atrial electrical impulse. Electrophysiological studies in dogs with this condition are encouraged to better understand the association between this index and AF.

Keywords: P wave duration, P wave indices, atrial fibrillation, arrhythmia.

3.3 INTRODUÇÃO

A dispersão da onda P (P_d) é um índice eletrocardiográfico definido como a diferença entre a duração mínima e máxima da onda P, sendo calculada a partir do registro de diferentes derivações do exame eletrocardiográfico (ECG) (NOSZCZYK-NOWAK et al., 2008). O cálculo da dispersão da onda P foi determinado a partir do estudo de Dilaveris et al. (1998), que objetivou identificar marcadores eletrocardiográficos simples que poderiam ser utilizados para avaliação do desenvolvimento da fibrilação atrial (FA) paroxística em pessoas. Neste estudo, os valores da P_d foram significativamente maiores em pacientes com FA paroxística quando comparados às pessoas do grupo controle, demonstrando grande utilidade deste índice no acompanhamento de distúrbios do ritmo cardíaco, sobretudo em relação ao desenvolvimento de arritmias supraventriculares.

O prolongamento da duração e da dispersão da onda P é consequência de uma despolarização atrial não homogênea secundária a injúrias crônicas, como o aumento da pressão atrial, isquemia miocárdica ou estresse metabólico (MAGNANI et al., 2009). As alterações nos valores da P_d podem ser consequências de distúrbios na condução inter e intra-atrial, além de refletir em uma propagação descontínua dos impulsos sinusais. A atividade elétrica da musculatura atrial está relacionada à condução em áreas específicas dos átrios. Sendo assim, distúrbios regionais e específicos de despolarização podem ocasionar variações na duração da onda P nas diferentes derivações do ECG, culminando em um valor elevado de P_d (NOSZCZYK-NOWAK et al., 2011).

Em humanos, a P_d tem sido estudada em vários contextos clínicos, incluindo estados de doença cardíaca e não cardíaca. A P_d foi definida como um importante índice de avaliação para o desenvolvimento de FA, assim como fator prognóstico (DILAVERIS & GIALAFOS, 2001; DOGAN et al., 2003; NIELSEN et al., 2015; LAZZERONI et al., 2016). Além disso, a elevação da P_d também foi verificada em pacientes com hipertensão e diabetes, fatores de risco independentes para o desenvolvimento de FA (YAZICI et al., 2007; DAGLI et al., 2008). Outros estudos demonstraram relação direta do aumento dos índices da onda P com enfermidades que culminam em disfunção diastólica, síndromes coronarianas e pessoas com o diagnóstico de cardiomiopatia dilatada (DILAVERIS et al., 1999; BAYKAN et al., 2003; SENEN et al., 2004; CELIK et al., 2005; GUNDUZ et al., 2005). Ainda, enfermidades que levam a doença cardíaca estrutural podem aumentar a pressão

atrial, prolongando potencialmente os índices de onda P. Doenças não relacionadas diretamente ao sistema cardiovascular podem aumentar a P_d , como verificado em pacientes submetidos à hemodiálise e com diagnóstico de hipertireoidismo e artrite reumatoide (TEZCAN et al., 2004; GULER et al., 2007; KATIRCIBASI et al., 2007). Estes estados de doença podem compartilhar vias comuns de inflamação e fibrose da musculatura cardíaca, que resultam no processo de remodelamento atrial e levam a falha na homogeneidade da condução (MAGNANI et al., 2009).

A obesidade é outra condição que afeta diretamente os índices da onda P em humanos, proporcionando maior risco para o desenvolvimento de arritmias cardíacas (MAGNANI et al., 2009). Já é definido que este estado de condição corporal está associado à sobrecarga atrioventricular esquerda, além de levar a anormalidades no enchimento ventricular e alterações na variabilidade da frequência cardíaca (MARINO et al., 2010). Estudos verificaram a associação entre o aumento da P_d em indivíduos obesos, o que representou um maior risco para o desenvolvimento de arritmias atriais nesses pacientes (SEYFELI et al., 2006; KOSAR et al., 2008). Também foi constatado que os valores de dispersão e duração da onda P em pessoas obesas foram reduzidos após perda de peso de forma substancial, tanto por dieta e uso de medicamentos quanto através de cirurgia bariátrica, sugerindo uma melhora nas anormalidades de repolarização atrial nestes pacientes (DURU et al., 2006; RUSSO et al., 2008; FALCHI et al., 2014).

São escassos os estudos da dispersão de onda P na medicina veterinária, incluindo a espécie canina. Noszczyk-Nowak et al. (2008) determinaram inicialmente os valores da P_d em cães saudáveis. O mesmo grupo de pesquisadores estudou posteriormente a dispersão da onda P em cães com cardiopatia valvar e cães com distúrbios na condução supraventricular (NOSZCZYK-NOWAK et al., 2011). Neste trabalho, a P_d foi significativamente elevada tanto nos animais com doença valvar crônica, quanto naqueles com distúrbios de ritmo cardíaco, quando comparados a animais saudáveis. Não existem informações na literatura referentes aos efeitos da condição corporal, especialmente a obesidade, sobre os valores de duração e dispersão de onda P em cães.

Este trabalho teve como objetivo determinar a duração mínima e máxima da onda P, além de calcular os valores de sua dispersão em cães com obesidade, correlacionando-os com índices de adiposidade e o tamanho do átrio esquerdo.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 76 cães de idade adulta, de porte pequeno a médio, independente do sexo e raça. Os animais foram submetidos à avaliação da condição corporal, bem como realização de exames laboratoriais, eletrocardiográficos e ecocardiográficos.

A avaliação da condição corporal foi efetuada através da determinação do escore corporal, sendo estipulado um valor em uma escala de 1 a 9, de acordo com a deposição de gordura em região costal e abdômen (LAFLAMME, 1997). Foram selecionados animais com condição corporal normal (escores 4 e 5) e animais com obesidade (escores 8 e 9). Também foram calculados dois índices de adiposidade: o índice de massa corporal (IMC), de acordo com Mueller et al. (2008) e a porcentagem de gordura corporal (%GC), segundo Burkholder & Toll (2000).

O ECG foi realizado com o aparelho TEB ECG-PC VET® (São Paulo-SP, Brasil), equipado com filtros de rede. Os cães foram posicionados em decúbito lateral direito e o traçado eletrocardiográfico foi registrado em seis derivações: DI, DII, DIII, aVR, aVL e aVF. Em 18 animais colocaram-se eletrodos para verificação das derivações pré-cordiais: rV2, V2, V4 e V10. Os traçados foram registrados durante 5 minutos e posteriormente analisados para a determinação da duração da onda P e cálculo da P_d . Em cada derivação avaliada, a duração da onda P foi mensurada como a distância entre seu início (começo de deflexão positiva ou negativa da linha isoeletrica) e seu término (retorno da deflexão à linha isoeletrica), registrada em milissegundos. Assim, dentre as seis derivações, determinou-se a duração mínima (P_{\min}) e a duração máxima (P_{\max}) da onda P. A dispersão da onda P foi calculada como a diferença entre a P_{\max} e a P_{\min} ($P_d = P_{\max} - P_{\min}$), realizando-se na sequência a média das medidas de três batimentos cardíacos distintos.

Todos os cães foram submetidos ao exame ecocardiográfico (Esaote® MyLab™ 30 VET, Gênova, Itália), sendo determinadas as dimensões do átrio esquerdo e da artéria aorta. Estas medidas foram obtidas em janela paraesternal direita, em corte transversal do coração e nível aórtico, mensurando o átrio esquerdo e a aorta em fase final da diástole, a partir da cúspide aórtica não coronariana. Através da determinação destas medidas, a relação entre o átrio esquerdo e a aorta foi calculada (AE/Ao). Valores de AE/Ao maiores que 1,37 foram indicativos de aumento atrial esquerdo (PRADA et al., 2012). O exame ecocardiográfico permitiu a identificação de cães com doença valvar crônica e foram excluídos da pesquisa os

animais com diagnóstico de cardiopatias congênitas ou cardiomiopatias.

Os animais foram selecionados com base em investigação laboratorial prévia, sendo excluídos os cães que detinham alterações significativas no hemograma e exames de bioquímica sérica (albumina, alanina aminotransferase, colesterol, creatinina, fosfatase alcalina, glicose, triglicerídeos, T4 livre e ureia).

Assim, os cães foram divididos em quatro grupos distintos:

- Grupo I: cães com condição corporal indicativa de obesidade, sem doença cardíaca;
- Grupo II: cães com condição corporal indicativa de obesidade e que apresentavam doença valvar crônica;
- Grupo III: cães com condição corporal ideal, com presença de doença valvar crônica;
- Grupo IV: cães saudáveis (condição corporal ideal, sem cardiopatia).

A análise estatística dos dados baseou-se na realização de medidas de tendência central e de dispersão para as medidas referentes à frequência cardíaca, P_{\min} , P_{\max} e P_d . Verificou-se a normalização dos dados com o teste de D'Agostino & Pearson. Para comparação de valores entre os grupos foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey para dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis e análise de comparações múltiplas de Dunn para dados não paramétricos. Ainda, efetuou-se a correlação de Pearson entre a P_d e o IMC, a %GC e a AE/Ao. Os testes estatísticos foram realizados através do *software* GraphPad Prism 5 (La Jolla, Califórnia, Estados Unidos).

3.5 RESULTADOS

O estudo foi realizado em 76 cães, divididos em quatro grupos distintos. No grupo I foram incluídos 18 cães (15 fêmeas e 3 machos), com idade de $9,8 \pm 2,8$ anos e peso corporal de $17,5 \pm 5,2$ Kg. O grupo II foi formado por 19 animais (13 fêmeas e 6 machos), com idade de $11,7 \pm 2,6$ anos e peso corporal de $14,2 \pm 4,2$ Kg. Dentre os animais deste grupo, 42% (8/19) apresentavam aumento de átrio esquerdo ($AE/Ao > 1,37$). Já no grupo III foram incluídos 19 cães (6 fêmeas e 13 machos), com idade de $12,2 \pm 1,9$ anos, peso corporal de $7,4 \pm 2,3$ Kg e cerca de 58% (11/19) detinham a condição de remodelamento atrial esquerdo. Por fim, o grupo IV foi formado por 20 cães (14 fêmeas e 6 machos), com idade de $10,9 \pm 2,5$ anos e peso corporal de $7,3 \pm 1,9$ Kg.

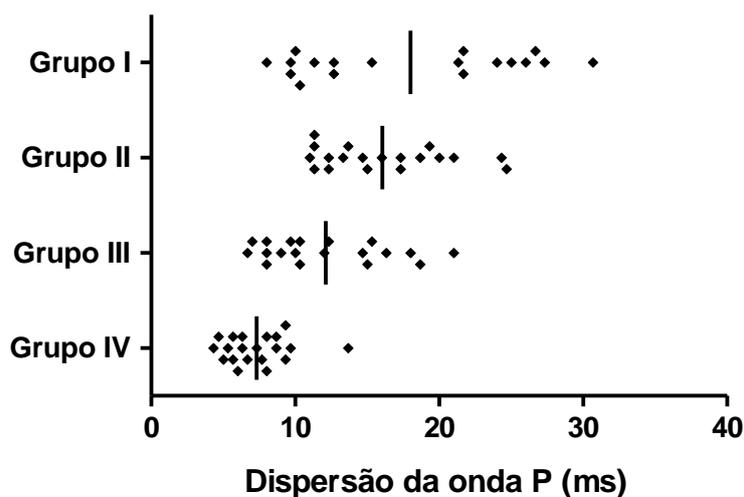
Encontram-se na Tabela 1 as medidas referentes à média e desvio padrão dos valores de frequência cardíaca, $P_{\text{mín}}$, $P_{\text{máx}}$ e P_d dos animais pertencentes aos grupos estudados. Houve diferença estatística, sobretudo, em relação aos valores da dispersão da onda P. Cães dos grupos I, II e III obtiveram valores significativamente mais elevados de P_d quando comparados ao grupo IV ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística destes parâmetros entre machos e fêmeas, independente do grupo ($p = 0,4527$).

Tabela 1 – Dispersão da onda P em cães. Resultados da média seguida do desvio padrão no que tange a frequência cardíaca, $P_{\text{mín}}$, $P_{\text{máx}}$ e P_d .

	Grupo I <i>Obeso</i>	Grupo II <i>Obeso-cardiopata</i>	Grupo III <i>Cardiopata</i>	Grupo IV <i>Saudável</i>
Frequência cardíaca (bpm)	140,4 ± 25,9 ^a	128,4 ± 36,1 ^{ab}	146,7 ± 32,3 ^a	112,7 ± 14,1 ^b
$P_{\text{mín}}$ (ms)	40,5 ± 5,4 ^a	40,4 ± 3,5 ^a	40,0 ± 4,8 ^a	46,7 ± 9,8 ^a
$P_{\text{máx}}$ (ms)	62,6 ± 8,1 ^a	60,4 ± 5,4 ^a	55,5 ± 7,4 ^a	55,9 ± 10,4 ^a
P_d (ms)	18,0 ± 7,6 ^a	16,1 ± 4,4 ^a	12,1 ± 4,3 ^a	7,3 ± 2,2 ^b

O Gráfico 1 demonstra os valores individuais e da média da P_d , sendo evidenciado valores significativamente maiores destes parâmetros nos cães dos grupos I, II e III.

Gráfico 1 – Valores individuais referentes à dispersão da onda P (ms) em cães, sendo evidenciado a média (|) em cada grupo.



Em relação aos animais com diagnóstico de insuficiência valvar (grupos II e III), compararam-se os valores de $P_{\text{mín}}$, $P_{\text{máx}}$ e P_d entre os cães com aumento de átrio esquerdo ($AE/Ao > 1,37$) e os que não apresentavam remodelamento,

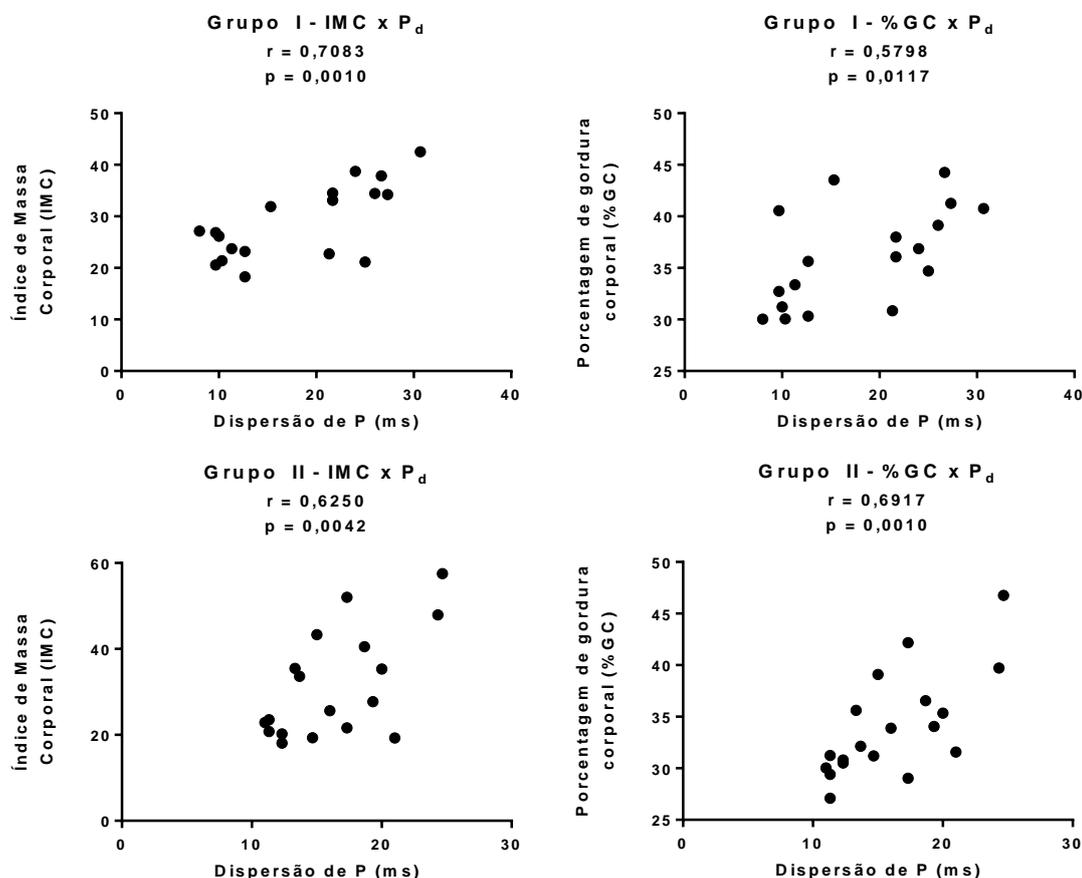
independente da condição corporal. Não houve diferença estatística em relação à P_{\min} e P_d (Tabela 2). Entretanto, animais com remodelamento de átrio esquerdo obtiveram valores significativamente maiores de P_{\max} .

Tabela 2 – Comparação entre cães com aumento de átrio esquerdo e cães sem remodelamento, sendo evidenciados os valores de média e desvio padrão dos índices da onda P em cães dos grupos II (obeso-cardiopata) e III (cardiopata).

	AE/Ao < 1,37	AE/Ao > 1,37	
P_{\min} (ms)	38,5 ± 3,7 ^a	41,5 ± 4,0 ^a	$p = 0,0660$
P_{\max} (ms)	54,1 ± 6,0 ^a	60,0 ± 6,1 ^b	$p = 0,0060$
P_d (ms)	13,2 ± 4,5 ^a	14,8 ± 4,9 ^a	$p = 0,3220$

Os dados de P_d foram correlacionados com o peso corporal, o IMC, a %GC e a relação AE/Ao em todos os grupos. Houve correlação significativa entre a P_d e os índices de adiposidade IMC e %GC somente nos cães com obesidade, pertencentes aos grupos I e II (Gráfico 2). Entretanto, não houve correlação entre a P_d e os valores referentes ao peso corporal e à relação AE/Ao.

Gráfico 2 – Correlação entre a P_d e os parâmetros de adiposidade relacionados ao índice de massa corporal (IMC) e porcentagem de gordura (%GC) nos cães obesos (grupo I) e cães obesos com cardiopatia valvar (grupo II).



Os 18 cães em que foram colocados eletrodos para registro de derivações pré-cordiais pertenciam aos quatro grupos distintos (quatro animais dos grupos I e III e cinco cães dos grupos II e IV). Não houve diferença estatística dos valores da P_d quando avaliados os traçados com e sem as derivações pré-cordiais ($p = 0,8470$).

3.6 DISCUSSÃO

A dispersão da onda P (P_d) é um índice eletrocardiográfico que pode ser utilizado para determinar o risco de desenvolvimento de arritmias atriais. O uso mais extenso da P_d tem sido em relação à avaliação do risco de fibrilação atrial em seres humanos. Entretanto, verificou-se que este parâmetro pode ser utilizado para identificar pacientes sem doença cardíaca aparente, mas ainda em maior risco de desenvolver FA. Este trabalho verificou a relação da P_d em cães com obesidade.

Não houve diferença estatística nos valores de P_d entre machos e fêmeas, o que permite supor que o valor da P_d é um fator independente em relação ao gênero, apesar de fêmeas terem sido selecionadas em maior número. No nosso estudo não foi avaliada a relação entre a idade e os valores da P_d , tendo em vista que foram selecionados animais com idade mínima de 8 anos. Também não foi verificada diferença estatística dos valores da P_d quando comparados os traçados de seis (DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF) e dez (DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF, rV2, V2, V4, V10) derivações. No estudo preliminar de Nosczyk-Nowak et al. (2008) foi determinado o valor da P_d em cães saudáveis também em seis derivações, demonstrando que as derivações uni e bipolares podem ser utilizadas para o cálculo deste índice, de forma independente da utilização de eletrodos precordiais.

Os índices de onda P têm sido associados a condições de doenças cardíacas e não cardíacas em seres humanos. Está bem definido que pessoas obesas apresentam maiores valores de dispersão da onda P, o que parece ser um fator de risco para desenvolvimento de arritmias cardíacas, especialmente a fibrilação atrial (DOGAN et al., 2003; GOUDIS et al., 2015). No que tange os índices de onda P e a medicina veterinária, não há informações prévias sobre a associação da obesidade e a elevação da duração e da dispersão da onda P. Os resultados deste trabalho demonstraram que cães obesos, com ou sem cardiopatia valvar e remodelamento atrial concomitante, apresentaram valores de P_d mais elevados quando comparados a cães saudáveis. Apesar de não ter sido evidenciada diferença estatística, verificamos uma tendência de aumento da $P_{máx}$ em cães obesos (grupos I e II). A

relação da obesidade com os índices de onda P foram verificados em estudos em seres humanos (DURU et al., 2006; SEYFELI et al., 2006; KOSAR et al., 2008; RUSSO et al., 2008; FALCHI et al., 2014). Estes trabalhos concluíram que a obesidade culminou em um aumento significativo da $P_{máx}$ e da P_d , porém, passível de redução após perda de peso. Além disso, estes estudos verificaram correlação positiva e significativa entre estes índices da onda P com o IMC dos indivíduos obesos. O aumento da duração e da dispersão da onda P em pessoas obesas está associado à condução atrial prolongada, ao remodelamento atrial esquerdo e ao predominante tônus autonômico simpático em indivíduos com esta condição, induzindo a modificações na velocidade de propagação do impulso. Existem evidências de alterações cardiovasculares estruturais e no sistema de condução elétrica decorrentes da obesidade (FRALEY et al., 2005; ABEL et al., 2008; ADOLPHE et al., 2014). Além disso, ocorre sobrecarga atrioventricular esquerda devido à maior volume plasmático e maior débito cardíaco, o que justifica o remodelamento cardíaco nestes pacientes. A obesidade também proporciona maior ativação do sistema nervoso simpático, promovendo eventos que culminam em vasoconstrição periférica e hipertensão sistêmica (MARINOU et al., 2010). Em humanos, além da elevação da P_d , as condições de idade avançada, hipertensão sistêmica crônica, diabetes mellitus e obesidade são identificadas como fatores de risco independentes para o desenvolvimento da FA (WANG et al., 2004; GOUDIS et al., 2015). Logo, estudos longitudinais em cães obesos são encorajados a fim de determinar a relação dos índices da onda P, sobretudo a $P_{máx}$ e a P_d , com o surgimento de arritmias cardíacas. Deste modo, estes resultados colaboram com a hipótese de que a obesidade está associada com risco aumentado para a fibrilação atrial e que a obesidade contribui para o desenvolvimento da FA.

No estudo, cães obesos apresentaram valores de P_d semelhantes a animais com cardiopatia valvar crônica. Noszczyk-Nowak et al. (2011) verificaram que a doença valvar crônica em cães está relacionada a valores mais elevados de P_d quando comparado com cães saudáveis. A doença mixomatosa da valva mitral é um processo patológico complexo e culmina em sobrecarga de volume atrioventricular esquerda, bem como em alterações na matriz extracelular, promovendo degeneração de colágeno, fibrose endocárdica e muscular e infarto intraparietal (ZHENG et al., 2009). Senen et al. (2004) verificaram que pessoas com cardiomiopatia dilatada obtiveram dimensões de átrio esquerdo significativamente

elevadas quando comparadas à indivíduos saudáveis, além de apresentar aumento nos valores de P_d . Estes processos conduzem à propagação não homogênea dos impulsos elétricos nos átrios que, juntamente com o remodelamento atrial, aumentam este índice eletrocardiográfico. Ainda a respeito dos valores da P_d nos grupos avaliados, animais pertencentes ao grupo IV obtiveram índices mais baixos em relação à média da dispersão de onda P. Pode-se então conjecturar que este é um índice constante em cães saudáveis, sendo um parâmetro independente para avaliar a condução inter e intra-atrial.

A respeito da correlação da P_d com índices de adiposidade, verificou-se associação com o IMC e a %GC em animais com obesidade. Kosar et al. (2008) também verificaram correlação significativa entre os valores da P_d e o IMC em pessoas obesas. Foi verificado que a P_d aumentou paralelamente junto aos índices de adiposidade em cães obesos, sugerindo que esta condição afeta diretamente este parâmetro eletrocardiográfico.

Quando avaliado em relação ao remodelamento atrial e de forma independentemente à condição corporal, houve associação entre a $P_{máx}$ e a relação AE/Ao somente em cães com aumento de átrio esquerdo. O vetor da ativação elétrica atrial acompanha o sentido dorso-ventral, crânio-caudal e a direção direita-esquerda, resultando no surgimento da onda P no traçado eletrocardiográfico. Logo, supôs-se inicialmente que quanto maior a área de tecido atrial excitada eletricamente, maior a duração da onda P (SURAWICZ, 1986). Entretanto, foi verificado que a duração da onda P está modestamente relacionada ao tamanho do átrio esquerdo, com fraca correlação com a relação AE/Ao, não sendo um indicador confiável de remodelamento atrial em cães (SAVARINO et al., 2012). No tocante à P_d e a relação AE/Ao não foi encontrada correlação entre estes índices, o que corrobora com dados de Noszczyk-Nowak et al. (2011). Logo, pode-se sugerir que a P_d é mais dependente de distúrbios de condução inter e intra-atrial e de propagação não homogênea dos impulsos elétricos do que de diferentes níveis de remodelamento atrial esquerdo.

3.7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi evidenciado que além de estar aumentada em cães com cardiopatia e insuficiência valvar, a elevação do índice da P_d está presente também em cães com obesidade e condição cardíaca normal. Isto demonstra um dos efeitos

do excesso de peso e acúmulo de tecido adiposo sobre o sistema cardiovascular de cães.

3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E. D.; LITWIN, S. E.; SWEENEY, G. Cardiac remodeling in obesity. **Physiol Rev**, 2008; 88:389–419.

ADOLPHE, J. L.; SILVER, T. I.; CHILDS, H.; DREW, M. D.; WEBER, L. P. Short-term obesity results in detrimental metabolic and cardiovascular changes that may not be reversed with weight loss in an obese dog model. **Br J Nutr**, 2014; 112(4):647-656.

BAYKAN, M.; CELIK, S.; ERDOL, C.; DURMUS, I.; OREM, C.; KUCUKOSMANOGLU, M.; YILMAZ, R. Effects of P-wave dispersion on atrial fibrillation in patients with acute anterior wall myocardial infarction. **Ann Noninvasive Electrocardiol**, 2003; 8:101–106.

BURKHOLDER, W. J.; TOLL, P. W. Obesity. In: HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L. **Small Animal Clinical Nutrition**. 4th ed. Topeka: Mark Morris Institute, 2000:401-430.

CELIK, T.; IYISOY, A.; KURSAKLIOGLU, H.; KILIC, S.; KOSE, S.; AMASYALI, B.; ISIK, E. Effects of primary percutaneous coronary intervention on P wave dispersion. **Ann Noninvasive Electrocardiol**, 2005; 10:342–347.

DAGLI, N.; KARACA, I.; YAVUZKIR, M.; BALIN, M.; ARSLAN, N. Are maximum P wave duration and P wave dispersion a marker of target organ damage in the hypertensive population? **Clin Res Cardiol** 97:98–104 (2008).

DILAVERIS, P. E.; ANDRIKOPOULOS, G. K.; METAXAS, G.; RICHTER, D. J.; AVGEROPOULOU, C. K.; ANDROULAKIS, A. M.; GIALAFOS, J. E. Effects of ischemia on P wave dispersion and maximum P wave duration during spontaneous anginal episodes. **Pacing Clin Electrophysiol**, 1999; 22:1640–1647.

DILAVERIS, P. E.; GIALAFOS, J. E. P-wave dispersion: a novel predictor of paroxysmal atrial fibrillation. **Ann Noninvasive Electrocardiol**, 2001; 6(2):159-165.

DILAVERIS, P. E.; GIALAFOS, E. J.; SIDERIS, S. K.; THEOPISTOU, A. M.; ANDRIKOPOULOS, G. K.; KYRIAKIDIS, M.; GIALAFOS, J. E.; TOUTOUZAS, P. K. Simple electrocardiographic markers for the prediction of paroxysmal idiopathic atrial fibrillation. **Am Heart J**, 1998; 135:733-738.

DOGAN, A.; ACAR, G.; GEDIKLI, O.; OZAYDIN, M.; NAZLI, C.; ALTINBAS, A.; ERGENE, O. A comparison of P-wave duration and dispersion in patients with short-term and long-term atrial fibrillation. **J Electrocardiol**, 2003; 36:3, 251-255.

DURU, M.; SEYFELI, E.; KUVANDIK, G.; KAYA, H.; YALCIN, F. Effect of weight loss on P wave dispersion in obese subjects. **Obesity**, 2006, 14:8, 1378-1382.

FALCHI, A. G.; GRECCHI, I.; MUGGIA, C.; TINELLI, C. Weight loss and P wave dispersion: a preliminary study. **Obes Res Clin Pract**, 2014; 8(6): e614-617.

FRALEY, M. A.; BIRCHEN, J. A.; SENKOTTAIYAN, N.; ALPERT, M. A. Obesity and the electrocardiogram. **Obes Rev**, 2005; 6(4):275-81.

GOUDIS, C. A.; KORANTZPOULOS, P.; NTALAS, I. V.; KALLERGIS, E. M.; KETIKOGLU, D. G. Obesity and atrial fibrillation: A comprehensive review of the pathophysiological mechanisms and links. **J Cardiol**, 2015; 66(5):361-369.

GULER, H.; SEYFELI, E.; SAHIN, G.; DURU, M.; AKGUL, F.; SAGLAM, H.; YALCIN, F. P wave dispersion in patients with rheumatoid arthritis: its relation with clinical and echocardiographic parameters. **Rheumatol Int** 2007; 27:813–818.

GUNDUZ, H.; BINAK, E.; ARINC, H.; AKDEMIR, R.; OZHAN, H.; TAMER, A.; UYAN, C. The relationship between P wave dispersion and diastolic dysfunction. **Tex Heart Inst J**, 2005; 32:163–167.

KATIRCIBASI, M. T.; DENIZ, F.; PAMUKCU, B.; BINICI, S.; ATAR, I. Effects of short-term propylthiouracil treatment on p wave duration and p wave dispersion in patients with overt hypertyroidism. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 2007; 115:376–379.

KOSAR, F.; AKSOY, Y.; ARI, F.; KESKIN, L.; SAHIN, I. P-wave duration and dispersion in obese subjects. **Ann Noninvasive Electrocardiol**, 2008; 13(1):3–7.

LAFLAMME, D. P. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. **Canine Practice**, 1997; 22:10-15.

LAZZERONI, D.; PARATI, G.; BINI, M.; PIAZZA, P.; UGOLOTTI, P. T.; CAMAIORA, U.; BRAMBILLA, L.; BRAMBILLA, V.; GUALERZI, M.; CORUZZI, P. P-wave dispersion predicts atrial fibrillation following cardiac surgery. **Int J Cardiol**, 2016 203:131-3.

MAGNANI, J. W.; WILLIAMSON, M.; ELLINOR, P. T.; MONAHAN, K. M.; BENJAMIN, E. J. P wave indices - Current status and future directions in epidemiology, clinical and research applications. **Circ Arrhythm Electrophysiol**, 2009; 2(1) 72–79.

MARINOU, K.; TOUSOULIS, D.; ANTONOPOULOS, A. S.; STEFANADI, E.; STEFANADIS, C. Obesity and cardiovascular disease: From pathophysiology to risk stratification. **Int J of Cardiol**, 2010; 138:3–8.

MUELLER, D. C. M.; SCHOSSLER, J. E.; PINHEIRO, M. Adaptação do índice de massa corporal humano para cães. **Ciência Rural**, 2008; v.38, n.4, 1038-1043.

NIELSEN, J. B.; KUHL, J. T.; PIETERSEN, A.; GRAFF, C.; LIND, B.; STRUIJK, J. J.; OLESEN, M. S.; SINNER, M. F.; BACHMANN, T. N.; HAUNSO, S.; NORDESTGAARD, B. G.; ELLINOR, P. T.; SVENDSEN, J. H.; KOFOED, K. F.; KOBER, L.; HOLST, A. G. P-wave duration and the risk of atrial fibrillation: Results from the Copenhagen ECG Study. **Heart Rhythm**, 2015; 12(9):1887-1895.

NOSZCZYK-NOWAK, A.; PASLAWSKA, U.; SZALAS, A.; NICPON, J. P-wave dispersion in healthy dogs. A preliminary study. **Bull Vet Inst Pulawy** 52, 683-688, 2008.

NOSZCZYK-NOWAK, A.; SZALAS, A.; PASLAWSKA, U.; NICPON, J. Comparison of P-wave dispersion in healthy dogs, dogs with chronic valvular disease and dogs with disturbances of supraventricular conduction. **Acta Vet Scand**, 53:18, 2011.

PRADA, D. G.; OLIVEIRA, V. M. C.; LARSSON, M. H. M. A.; YAMAKI, F. L. Avaliação ecocardiográfica do átrio esquerdo de cães sadios por meio do modo-M convencional e do modo bidimensional. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.64, n.3, p.585-592, 2012.

RUSSO, V.; AMMENDOLA, E.; CRESCENZO, I.; DOCIMO, L.; SANTANGELO, L.; CALABRÒ, R. Severe obesity and p-wave dispersion: the effect of surgically induced weight loss. **Obes Surg**, 2008, 18:90-96.

SAVARINO, P.; BORGARELLI, M.; TARDUCCI, A.; CROSARA, S.; BELLO, N. M.; MARGIOCCO, M. L. Diagnostic performance of P wave duration in the identification of left atrial enlargement in dogs. **J Small Anim Pract**, 2012; 53(5):267-272.

SEZEN, K.; TURHAN, H.; ERBAY, A. R.; BASAR, N.; YASAR, A. S.; SAHIN, O.; YETKIN, E. P-wave duration and P-wave dispersion in patients with dilated cardiomyopathy. **Eur J Heart Fail**, 2004; 6(5):567-569.

SEYFELI, E.; DURU, M.; KUVANIK, G.; KAYA, H.; YALCIN, F. Effect of obesity on P-wave dispersion and QT dispersion in women. **Int J Obes**, (2006) 30, 957–961.

SURAWICZ, B. Electrocardiographic diagnosis of chamber enlargement **J Am Coll Cardiol**, 1986; 8(3):711-724.

TEZCAN, U. K.; AMASYALI, B.; CAN, I.; AYTEMIR, K.; KOSE, S.; YAVUZ, I. KURSAKLIOGLU, H.; ISIK, E.; DEMIRTAS, E.; OTO, A. Increased P wave dispersion and maximum P wave duration after hemodialysis. **Ann Noninvasive Electrocardiol** 2004; 9:34–38.

YAZICI, M.; OZDEMIR, K.; ALTUNKESER, B. B.; KAYRAK, M.; DUZENLI, M. A.; VATANKULU, M. A.; SOYLU, A.; ULGEN, M. S. The effect of diabetes mellitus on the P-wave dispersion. **Circ J** 2007; 71:880–883.

WANG, T. J.; PARISE, H.; LEVY, D.; D'AGOSTINO, R. S.; WOLF, P. A.; VASAN, R. S.; BEJAMIN, E. J. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. **J Am Med Assoc**, 2004; 292(20):2471-2477.

ZHENG, J.; CHEN, Y.; PAT, B.; DELL'ITALIA, L. A.; TILLSON, M.; DILLON, A. R.; POWELL, P. C.; SHI, K.; SHAH, N.; DENNEY, T.; HUSAIN, A.; DELL'ITALIA, L. J. Microarray identifies extensive downregulation of noncollagen extracellular matrix and profibrotic growth factor genes in chronic isolated mitral regurgitation in the dog. **Circulation**, 2009; 119(15):2086-2095.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação evidenciou eventos deletérios ao sistema cardiovascular relacionados à obesidade em cães. Foi verificado que a condição de obesidade favorece o aparecimento de alterações estruturais no coração, sobretudo em relação ao remodelamento ventricular excêntrico e concêntrico. Além disso, verificamos que, além de ter sido identificada como um índice de adiposidade com alta correlação com o índice de massa corporal e a porcentagem de gordura corporal, a leptina também está relacionada à hipertensão sistêmica e ao remodelamento ventricular em cães obesos. No que tange à avaliação eletrocardiográfica dos cães com obesidade, foram determinados elevados valores de duração e dispersão de onda P.

Salientamos a necessidade de estudos longitudinais que verifiquem os efeitos deletérios sistêmicos da obesidade em cães, principalmente no que se diz respeito ao papel das adipocinas. Torna-se importante também o conhecimento dos efeitos da perda de peso nos animais obesos e a eventual possibilidade de reversão destas alterações.

5 ANEXOS

Anexo 1 – Mapeamento das amostras 1-38 em duplicata nas placas de ELISA para determinação da concentração sérica de leptina canina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco ng/mL	Padrão 1:8 6,875 ng/mL	QC 1 1,7-3,4 ng/mL	Amostra 3 17,17 ng/mL	Amostra 7 49,89 ng/mL	Amostra 11 46,741 ng/mL	Amostra 15 17,44 ng/mL	Amostra 19 38,25 ng/mL	Amostra 23 18,11 ng/mL	Amostra 27 12,49 ng/mL	Amostra 31 13,02 ng/mL	Amostra 35 14,33 ng/mL
B	Branco ng/mL	Padrão 1:8 6,875 ng/mL	QC 1 1,7-3,4 ng/mL	Amostra 3 18,74 ng/mL	Amostra 7 45,96 ng/mL	Amostra 11 42,369 ng/mL	Amostra 15 17,84 ng/mL	Amostra 19 37,21 ng/mL	Amostra 23 24,35 ng/mL	Amostra 27 15,72 ng/mL	Amostra 31 11,58 ng/mL	Amostra 35 11,81 ng/mL
C	Padrão 1:64 0,859375 ng/mL	Padrão 1:4 13,75 ng/mL	QC 2 12-26 ng/mL	Amostra 4 13,02 ng/mL	Amostra 8 17,43 ng/mL	Amostra 12 15,57 ng/mL	Amostra 16 31,95 ng/mL	Amostra 20 17,44 ng/mL	Amostra 24 1,354 ng/mL	Amostra 28 6,375 ng/mL	Amostra 32 6,352 ng/mL	Amostra 36 17,65 ng/mL
D	Padrão 1:64 0,859375 ng/mL	Padrão 1:4 13,75 ng/mL	QC 2 12-26 ng/mL	Amostra 4 15,11 ng/mL	Amostra 8 18,26 ng/mL	Amostra 12 17,3 ng/mL	Amostra 16 29,04 ng/mL	Amostra 20 18,60 ng/mL	Amostra 24 1,713 ng/mL	Amostra 28 5,411 ng/mL	Amostra 32 6,672 ng/mL	Amostra 36 18,849 ng/mL
E	Padrão 1:32 1,718 ng/mL	Padrão 1:2 27,5 ng/mL	Amostra 1 1,29 ng/mL	Amostra 5 9,783 ng/mL	Amostra 9 29,58 ng/mL	Amostra 13 45,77 ng/mL	Amostra 17 29,19 ng/mL	Amostra 21 11,39 ng/mL	Amostra 25 24,45 ng/mL	Amostra 29 3,225 ng/mL	Amostra 33 9,992 ng/mL	Amostra 37 2,238 ng/mL
F	Padrão 1:32 1,718 ng/mL	Padrão 1:2 27,5 ng/mL	Amostra 1 2,594 ng/mL	Amostra 5 8,381 ng/mL	Amostra 9 31,94 ng/mL	Amostra 13 61,33 ng/mL	Amostra 17 25,26 ng/mL	Amostra 21 14,60 ng/mL	Amostra 25 26,00 ng/mL	Amostra 29 3,329 ng/mL	Amostra 33 9,049 ng/mL	Amostra 37 2,017 ng/mL
G	Padrão 1:16 3,4375 ng/mL	Padrão 55 ng/mL	Amostra 2 3,943 ng/mL	Amostra 6 16,169 ng/mL	Amostra 10 36,102 ng/mL	Amostra 14 8,929 ng/mL	Amostra 18 16,35 ng/mL	Amostra 22 5,375 ng/mL	Amostra 26 2,347 ng/mL	Amostra 30 12,38 ng/mL	Amostra 34 6,637 ng/mL	Amostra 38 2,165 ng/mL
H	Padrão 1:16 3,4375 ng/mL	Padrão 55 ng/mL	Amostra 2 4,249 ng/mL	Amostra 6 22,341 ng/mL	Amostra 10 29,605 ng/mL	Amostra 14 9,617 ng/mL	Amostra 18 14,38 ng/mL	Amostra 22 5,617 ng/mL	Amostra 26 2,562 ng/mL	Amostra 30 13,43 ng/mL	Amostra 34 7,847 ng/mL	Amostra 38 2,128 ng/mL

Anexo 2 – Mapeamento das amostras 39-76 em duplicata nas placas de ELISA para determinação da concentração sérica de leptina canina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco 6,875 ng/mL	Padrão 1:8 6,875 ng/mL	QC 1 1,7 a 3,4 ng/mL	Amostra 41 42,32 ng/mL	Amostra 45 14,10 ng/mL	Amostra 49 45,13 ng/mL	Amostra 53 1,929 ng/mL	Amostra 57 8,821 ng/mL	Amostra 61 3,658 ng/mL	Amostra 65 8,015 ng/mL	Amostra 69 11,02 ng/mL	Amostra 73 1,98 ng/mL
B	Branco 6,875 ng/mL	Padrão 1:8 6,875 ng/mL	QC 1 1,7 a 3,4 ng/mL	Amostra 41 38,07 ng/mL	Amostra 45 16,05 ng/mL	Amostra 49 34,53 ng/mL	Amostra 53 1,777 ng/mL	Amostra 57 7,933 ng/mL	Amostra 61 3,987 ng/mL	Amostra 65 9,265 ng/mL	Amostra 69 13,56 ng/mL	Amostra 73 1,853 ng/mL
C	Padrão 1:64 0,859375 ng/mL	Padrão 1:4 13,75 ng/mL	QC 2 12 a 26 ng/mL	Amostra 42 16,47 ng/mL	Amostra 46 14,86 ng/mL	Amostra 50 38,08 ng/mL	Amostra 54 3,054 ng/mL	Amostra 58 2,722 ng/mL	Amostra 62 10,19 ng/mL	Amostra 66 9,692 ng/mL	Amostra 70 8,644 ng/mL	Amostra 74 19,2 ng/mL
D	Padrão 1:64 0,859375 ng/mL	Padrão 1:4 13,75 ng/mL	QC 2 12 a 26 ng/mL	Amostra 42 21,62 ng/mL	Amostra 46 15,38 ng/mL	Amostra 50 43,02 ng/mL	Amostra 54 3,11 ng/mL	Amostra 58 2,694 ng/mL	Amostra 62 11,44 ng/mL	Amostra 66 7,63 ng/mL	Amostra 70 9,21 ng/mL	Amostra 74 19,11 ng/mL
E	Padrão 1:32 1,71875 ng/mL	Padrão 1:2 27,5 ng/mL	Amostra 39 3,836 ng/mL	Amostra 43 49,65 ng/mL	Amostra 47 32,64 ng/mL	Amostra 51 40,39 ng/mL	Amostra 55 7,529 ng/mL	Amostra 59 5,706 ng/mL	Amostra 63 0,89 ng/mL	Amostra 67 2,319 ng/mL	Amostra 71 4,521 ng/mL	Amostra 75 1,929 ng/mL
F	Padrão 1:32 1,71875 ng/mL	Padrão 1:2 27,5 ng/mL	Amostra 39 6,541 ng/mL	Amostra 43 45,29 ng/mL	Amostra 47 42,18 ng/mL	Amostra 51 52,32 ng/mL	Amostra 55 7,331 ng/mL	Amostra 59 8,139 ng/mL	Amostra 63 1,534 ng/mL	Amostra 67 2,505 ng/mL	Amostra 71 3,201 ng/mL	Amostra 75 2,161 ng/mL
G	Padrão 1:16 3,4375 ng/mL	Padrão 55 ng/mL	Amostra 40 25,16 ng/mL	Amostra 44 26,13 ng/mL	Amostra 48 14,10 ng/mL	Amostra 52 3,658 ng/mL	Amostra 56 2,532 ng/mL	Amostra 60 6,91 ng/mL	Amostra 64 6,42 ng/mL	Amostra 68 2,135 ng/mL	Amostra 72 12,63 ng/mL	Amostra 76 12,86 ng/mL
H	Padrão 1:16 3,4375 ng/mL	Padrão 55 ng/mL	Amostra 40 26,531 ng/mL	Amostra 44 32,05 ng/mL	Amostra 48 19,2 ng/mL	Amostra 52 4,294 ng/mL	Amostra 56 2,97 ng/mL	Amostra 60 8,422 ng/mL	Amostra 64 7,941 ng/mL	Amostra 68 2,24 ng/mL	Amostra 72 13,98 ng/mL	Amostra 76 14,35 ng/mL