



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA ZAGHI CAVALCANTE

IMUNOEXPRESSÃO TECIDUAL DE TNF- $\alpha$  E MARCADORES SÉRICOS DE  
ESTRESSE OXIDATIVO EM CADELAS OBESAS: POSSÍVEIS FATORES  
ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE EM CÃES

CURITIBA

2018

CAROLINA ZAGHI CAVALCANTE

IMUNOEXPRESSÃO TECIDUAL DE TNF- $\alpha$  E MARCADORES SÉRICOS DE  
ESTRESSE OXIDATIVO EM CADELAS OBESAS: POSSÍVEIS FATORES  
ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE EM CÃES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial à obtenção do grau de Doutora em  
Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Anita Nishiyama.

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas –CRB/9-939)

Hendges, Carolina Zaghi Cavalcante

Imunoexpressão tecidual de TNF- $\alpha$  e marcadores séricos de estresse oxidativo em cadelas obesas: possíveis fatores envolvidos na fisiopatologia da obesidade em cães. / Carolina Zaghi Cavalcante Hendges. – Curitiba, 2018.  
103 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Anita Nishiyama

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Obesidade. 2. Cão. 3. Citocinas. I. Título II. Nishiyama, Anita. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 599.74442





Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

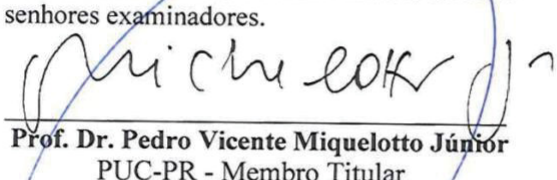


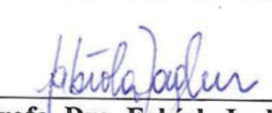
## Ata da Defesa de Tese de Doutorado de CAROLINA ZAGHI CAVALCANTE


Aos dezessete dias do mês de maio do ano de dois mil e dezoito, foi realizada no auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de tese da doutoranda **CAROLINA ZAGHI CAVALCANTE**, intitulada **“IMUNOEXPRESSIONE TECIDUAL DE TNF –  $\alpha$  E MARCADORES SÉRICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CADELAS OBESAS: POSSÍVEIS FATORES ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE EM CÃES.”**. A abertura teve início às 14h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da candidata, Professora Doutora Anita Nishiyama. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua tese. Após a explanação oral, a Professora Doutora Anita Nishiyama passou à palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Marconi Rodrigues de Farias da Clínica Médica de Animais de Companhia e Imunologia Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Na sequência, passou à palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Pedro Vicente Miquelotto Júnior da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Em seguida passou à palavra a terceira examinadora, Professora Doutora Fabíola Iagher do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e por último passou a palavra ao quarto examinador, Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes, do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Anita Nishiyama fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “Aprovação”, habilitando-a ao título de Doutora em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nos artigos 59º e 61º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação, bem como o artigo 45 da resolução 32/17 do CEPE-UFPR. Eu, Professora Doutora Anita Nishiyama, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

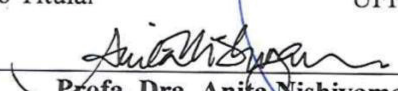
Curitiba, 17 de maio de dois mil e dezoito.

  
Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias  
PUC-PR - Membro Titular

  
Prof. Dr. Pedro Vicente Miquelotto Júnior  
PUC-PR - Membro Titular

  
Prof. Dra. Fabíola Iagher  
UFPR - Membro Titular

  
Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes  
UFPR - Membro Titular

  
Prof. Dra. Anita Nishiyama  
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **CAROLINA ZAGHI CAVALCANTE** para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer à Aprovação (aprovação/reprovação) da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação, bem como do item III do artigo 80 da resolução 65/09 do CEPE-UFPR.

Curitiba, 17 de maio de 2018.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
Aprovada	<b>Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias</b> PUC-PR - Membro Titular	
Aprovada	<b>Prof. Dr. Pedro Vicente Miquelotto Júnior</b> PUC-PR - Membro Titular	
Aprovada	<b>Profa. Dra. Fabíola Iagher</b> UFPR - Membro Titular	
Aprovada	<b>Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes</b> UFPR - Membro Titular	
Aprovada	<b>Profa. Dra. Anita Nishiyama</b> UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora	

**Dedico este trabalho a minha família,  
meu bem mais precioso:**

***Marciano, Laura e Olívia.***

**Aos meus pais *Luiz e Kêmeli,*  
incentivadores e exemplos de vida.**

**As minhas irmãs**

***Daniele e Adriana***

**e a minha linda sobrinha *Julia.***

**Vocês são o meu centro de amor.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Professora Anita Nishiyama, minha orientadora, uma grande mulher que propaga valores como determinação, dedicação, visão otimista de situações adversas. Que além de orientar este estudo me mostrou os melhores caminhos na arte da pesquisa.

A todos os estudantes, médicos veterinários aprimorandos, colaboradores e professores da PUCPR, pela ajuda na triagem dos pacientes. Em especial a Andressa Thaís Roncoski, Juliana de Souza Nogueira, Vanessa Cunningham Gmyterco e Rayane Sol Amaral Silva Sgarbossa.

A Lidiane Maria Boldrini Leite colaboradora do Laboratório de Tecnologia e Cultivo Celular da PUCPR, por possibilitar a realização de parte da minha pesquisa.

Ao laboratório Provet e Idexx, nas figuras de queridas amigas respectivamente, Priscila Viau Furtado e Aline Baumann da Rocha Gizzi, sem a contribuição de vocês não seria possível a execução desta pesquisa.

Aos queridos amigos Antonia Maria Prado do Rocio, Ana Paula Sarraff Lopes e Marconi Rodrigues de Farias, por todas as palavras de apoio e carinho, além de uma amizade e companherismo.

Ao meu marido Marciano, uma pessoa única, um homem compreensivo, dedicado a família, exemplo de pai, sempre me motivando a ir em busca dos meus objetivos e sempre presente nas minhas ausências, sem você nada disto seria possível.

A todos os responsáveis de cães obesos que possibilitaram a realização da pesquisa.



## RESUMO

A obesidade é a doença nutricional e metabólica mais frequente em cães e, está associada a diversas alterações endócrinas e inflamatórias. Embora esta correlação esteja bem estabelecida em humanos, em cães os dados são escassos e existem controvérsias sobre os mecanismos para estas complicações na espécie. Assim, o presente estudo realizou duas abordagens investigativas que avaliaram, em diferentes situações, citocinas e marcadores de estresse oxidativo em cadelas obesas. A primeira abordagem objetivou comparar o tecido adiposo subcutâneo e visceral de cadelas obesas e cadelas com condição corporal normal, quanto à presença de infiltrado leucocitário, tamanho e número dos adipócitos e a correlação com a imunexpressão do fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Nesta investigação, foram utilizados fragmentos de tecido adiposo subcutâneo e visceral das cadelas obesas e eutróficas que foram obtidos a partir de ovariossalpingohisterectomia eletiva. Quanto às avaliações histopatológicas e imunohistoquímicas observou-se correlação positiva entre o tamanho adipocitário e a expressão de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo visceral das cadelas obesas, enquanto no tecido subcutâneo esta associação não foi observada. Do mesmo modo, o tamanho adipocitário e a presença de infiltrado leucocitário foi significativamente maior nos animais obesos em comparação aos animais com condição corporal normal, que não tiveram infiltração leucocitária detectada. Na segunda abordagem, avaliou-se cadelas obesas antes e depois de um rápido programa de perda de peso em que foram determinados marcadores da peroxidação lipídica, de resistência insulínica e marcadores renais precoces, além de cortisol e hormônio tireoidiano. As cadelas incluídas no estudo, foram submetidas a mensuração do cortisol basal e, após a estimulação com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), avaliou-se tiroxina livre (T4L), insulina, das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), concentração sérica da dimetilarginina simétrica (SDMA) e albuminúria, além de hemograma; análises bioquímicas sanguíneas, urinálise, pressão arterial sistólica, que foram realizados como triagem. Como resultado deste estudo todas as cadelas obesas apresentaram alterações no fator de peroxidação lipídica mensurado. Todas as mensurações realizadas antes do emagrecimento apresentaram valores de TBARS acima do valor de referência, com significativa redução dos valores em todos os animais após a perda de peso. Quanto as mensurações de SDMA, 80% dos animais reduziram os valores de SDMA após o programa de perda de peso. Quanto as medidas hormonais e de resistência insulínica, não foi observado diferença entre os parâmetros. Com os estudos em conjunto, é possível sugerir que o a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  do tecido adiposo visceral pode estar envolvida com as alterações metabólicas em cadelas obesas e, que a obesidade ocasiona também um desequilíbrio do sistema oxidante/antioxidante e, este quadro, após a instituição de um rápido programa de perda de peso, leva à redução na mensuração de TBARS e SDMA, podendo existir entre eles, uma relação causal provocada pela obesidade. No entanto, sugere-se a necessidade de mais estudos para comprovar uma relação do estado crônico de inflamação, provocado pela obesidade, promovendo estresse oxidativo e produção de radicais livres, o que pode ocasionar resistência insulínica e que, parâmetros como SDMA e TBARS, poderiam representar marcadores importantes e precoces de alterações fisiopatológicas da obesidade.

**Palavras-chave:** Obesidade. Cadelas. Citocina. Adipócito. Peroxidação lipídica.



## ABSTRACT

Obesity is the most frequent nutritional and metabolic disease in dogs associated to endocrinal and inflammatory clinical disorders. Although this association is well described in humans, there is still a paucity of information on the canine systemic response and most reports seem contradictory. Therefore, the present study was comprised by two experiments to evaluate, in different conditions, cytokines and oxidative stress markers in obese female dogs. The first experiment compared, in visceral and subcutaneous adipose tissue, between obese and healthy weighted female dogs, the presence of leucocytic infiltrate, number and size of adipocytes, and their correlations to tumoral necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) expression. Subcutaneous and visceral adipose tissue were obtained in both animal groups undergoing elective ovariohysterectomy. In obese females, larger adipocytes and higher leucocytic infiltration were observed in histopathology and immunohistochemistry, respectively. Similarly, a positive correlation between adipocyte size and TNF- $\alpha$  expression was observed in visceral adipose tissue. In the second experiment, obese female dogs were evaluated before and after an eight-week weight loss program. Serum concentrations of free thyroxine (free T4), insulin, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), symmetric dimethylarginine assay (SDMA) were measured, along with basal serum cortisol levels and serum cortisol levels after adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation. Additionally, animals were regularly screened for parameters such as hemogram, biochemical serum tests, urinalysis, and systolic blood pressure. All obese female dogs presented increased lipidic peroxidation, regardless the measured time-point. TBARS results were above reference values in the first time-point, reducing significantly after the weight loss program; while SDMA values reduced in 80% of all subjects. No differences were observed in insulinemic resistance or hormones measured in both time-points. Both studies suggest that TNF- $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine, in visceral adipose tissue might be related to metabolic disorders in obese female dogs, and that obesity leads to an unbalance in the oxidative/antioxidative system. The prescription of a weight loss program resulted in lower TBARS and SDMA values, indicating an association with obesity. Therefore, SDMA and TBARS, would represent important early markers of obesity physiopathological consequences. Nevertheless, more studies are necessary to demonstrate the relationship between obesity and the onset of chronic inflammation, usually associated to insulinemic resistance, not observed in the current study.

**Keywords:** Obesity. Female dogs. Adipocyte. Cytokine. Lipidic peroxidation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Mecanismo de ocorrência do estresse oxidativo. Os sistemas de defesa antioxidante quando eficientes, mantêm a homeostase e quando ineficientes permitem a instalação do estresse oxidativo com dano celular e prejuízo na função biológica .....	23
<b>FIGURA 2</b> – Coleta de tecido adiposo visceral, feita por técnica excisional com retirada do ligamento falciforme em uma cadela do grupo obesas .....	33
<b>FIGURA 3</b> – Imagens de histopatologia, coradas em Hematoxilina-Eosina (HE), com ampliação de 10x, demonstrando a mensuração dos adipócitos com o software Zen (Zeiss Microscope). a) Tecido adiposo subcutâneo de um animal do grupo obeso. b) Tecido adiposo subcutâneo de uma cadela do grupo controle .....	34
<b>FIGURA 4</b> – Cadelas obesas com escore corporal (ECC) 9/9, incluídas no estudo .....	36
<b>FIGURA 5</b> – Obtenção da estatura do cão para o cálculo do índice de massa corporal canino (IMCC). a) Linha preta representa o trajeto da fita métrica sobre a coluna até o limite plantar do membro posterior, adaptado de Muller et al., 2008. b) Paciente da rotina clínica realizando a medida da altura para o cálculo de IMCC .....	38
<b>FIGURA 6</b> – Equipamentos necessários para mensuração indireta da pressão arterial sistólica em cães .....	39
<b>FIGURA 7</b> – Leitor de ELISA Biochrom Asys Expert Plus®, Cambridge, UK	41
<b>FIGURA 8</b> – Imagens de histopatologia, coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) com ampliação de 10x. a) Infiltrado leucocitário no tecido adiposo visceral de um animal obeso. b) Tecido adiposo visceral sem infiltrado leucocitário em um animal pertencente ao grupo controle .....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Dados referentes a idade, definição racial e peso dos animais obesos pertencentes ao estudo .....	44
<b>TABELA 2</b> – Tamanho do adipócito, número de adipócitos e imunexpressão do fator alfa de necrose tumoral no tecido adiposo com valores de média, desvio padrão e intervalo de confiança .....	46
<b>TABELA 3</b> – Dados referentes a idade, definição racial, peso dos animais incluídos no estudo .....	47
<b>TABELA 4</b> – Valores individuais de escore de condição corporal (ECC), índice de massa corporal canina (IMCC), porcentagem de gordura corporal (%GC), pressão arterial sistólica e medida da camada adiposa de L7 .....	48
<b>TABELA 5</b> – Escore de condição (ECC) com os valores da mediana, valor mínimo, valor máximo e valor de p dos animais incluídos no estudo .....	49
<b>TABELA 6</b> – Índice de massa corporal (IMCC), porcentagem de gordura corporal (%GC), pressão arterial sistólica (PAS), medida da camada adiposa do tecido subcutâneo na sétima vertebra lombar (US L7) representados pelos valores da média, desvio padrão e valor de p das variáveis dos animais incluídos no estudo .....	50
<b>TABELA 7</b> – Valores individuais de cortisol basal e após teste de estimulação com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) dos animais incluídos no estudo .....	50
<b>TABELA 8</b> – Valores do cortisol basal e do cortisol após o teste de estimulação com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) representados pela média, desvio padrão e valor de p.....	51
<b>TABELA 9</b> – Valores individuais da tiroxina livre (T4L) dos animais incluídos no estudo .....	52
<b>TABELA 10</b> – Valores individuais do teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), insulina, índice insulinogênico (II) dos	





## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1</b> – Valores individuais da pressão arterial sistólica (PAS) dos animais incluídos no estudo, nos tempos 0 e 1 .....	49
<b>GRÁFICO 2</b> – Médias dos valores de tiroxina livre (T4L) no tempo 0 e tempo .....	1 52
.....	
<b>GRÁFICO 3</b> – Representação gráfica dos valores individuais das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) dos animais no tempo 0 e tempo 1. Valores da mediana maracados em azul .....	55
<b>GRÁFICO 4</b> – Representação gráfica dos valores individuais da dimetilarginina simétrica (SDMA) dos animais no tempo 0 e tempo 1. Valores médios marcados com cor azul .....	58
<b>GRÁFICO 5</b> – Representação dos valores da média, percentuais de 25% e 75% e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da dimetilarginina simétrica (SDMA) das cadelas pertencentes ao estudo, tempo 0 e 1 (SDMA p=0,001 * Teste t amostras pareadas) .....	59
<b>GRÁFICO 6</b> – Valores individuais da albuminúria dos animais incluídos no estudo, nos tempos 0 e 1 .....	59

.....

## LISTA DE ABREVIATURAS

%GC	Porcentagem de gordura corporal
11 $\beta$ HSD-1	11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 1
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AGL	Ácidos graxos livres
CAT	Catalase
CRH	Hormônio estimulante de corticotrofina
CVE	Clínica Veterinária Escola
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença renal crônica
ECC	Escore de condição corporal
EDTA	Ácido de etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GH	Hormônio de crescimento
GLUT-4	Transportadores de glicose específicos do tipo 4
GPx	Glutathione peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
HOMA	Modelo de avaliação da homeostase
HOMA B	Percentual de atividade das células beta
HOMA R	Sensibilidade da insulina as células beta
HPA	Eixo hipotalâmico hipofisário adrenal
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IGF-1	Fator 1 de crescimento semelhante a insulina
II	Índice insulinogênico
ikK	Quinase inibidora do fator nuclear
ikKB	Inibidor do fator nuclear Kappa B
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6

IMCC	Índice de massa corporal canina
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	Substrato 2 do receptor de insulina
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
L7	Sétima vertebra lombar
MDA	Malondialdeído
NF-kB	Fator nuclear de transcrição kappa B
NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PI3q	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PPP	Programa de perda de peso
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RI:GC	Relação insulina:glicose corrigida
RNA	Ácido ribonucleico
SAE	Sistema enzimático
SANE	Sistema não-enzimático
SDMA	Dimetilarginina simétrica
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SRD	Sem raça definida
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
T4L	Tiroxina livre
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TFG	Taxa de filtração glomerular
TLR-4	<i>Toll like receptors 4</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNF- $\alpha$	Fator alfa de necrose tumoral
TSH	Hormônio estimulante da tireóide

## LISTA DE SIGLAS

°C	Graus celsius
cm	Centímetro
dL	Decilitro
Kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitros
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmol	Milimolar
nm	Nanômetros
ng	Nanograma
µg	Micrograma
µm	Micrômetro



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE.....	17
1.1.1 Tecido adiposo .....	17
1.1.2 Eixo hipotálamo, hipófise, adrenal .....	19
1.1.3 Hormônio tireoidiano e obesidade .....	21
1.1.4 Estresse oxidativo, resistência insulínica e obesidade.....	22
1.1.5 Parâmetros renais na obesidade .....	25
<b>2 JUSTIFICATIVAS .....</b>	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 DELINEAMENTO DA PRIMEIRA ABORDAGEM.....	31
4.1.1 Animais .....	31
4.1.2 Exames complementares .....	31
4.1.3 Análises estatísticas.....	35
4.2 DELINEAMENTO DA SEGUNDA ABORDAGEM.....	35
4.2.1 Animais .....	36
4.2.2 Avaliação do Eixo hipotálamo, hipófise, adrenal .....	40
4.2.3 Avaliação do Hormônio tireoidiano .....	40
4.2.4 Avaliação da peroxidação lipídica e insulina .....	40
4.2.5 Avaliação de parâmetros renais .....	42
4.2.6 Análises estatísticas .....	43
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
5.1 PRIMEIRA ABORDAGEM .....	44
5.1.1 Tamanho do adipócito .....	44
5.1.2 Infiltrado leucocitário .....	45
5.1.3 Número de adipócitos .....	45
5.1.4 Imunoexpressão de TNF- $\alpha$ .....	46
5.2 SEGUNDA ABORDAGEM.....	47
5.2.1 Avaliação do Eixo hipotálamo, hipófise, adrenal .....	50
5.2.2 Avaliação do Hormônio tireoidiano.....	51
5.2.3 Avaliação da peroxidação lipídica e insulina.....	53
5.2.4 Avaliação dos parâmetros renais .....	56

5.2.5 Análise de Correlações .....	60
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
6.1. PRIMEIRA ABORDAGEM .....	62
6.2. SEGUNDA ABORDAGEM .....	64
6.2.1 Eixo hipotálamo, hipófise, adrenal .....	64
6.2.2 Hormônio tireoidiano .....	65
6.2.3 Peroxidação lipídica e insulina .....	66
6.2.4 Parâmetros renais .....	68
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como acúmulo excessivo de tecido adiposo no corpo, suficiente para prejudicar as funções fisiológicas do organismo (BRUNETTO *et al.*, 2010). É o resultado de desequilíbrio entre energia consumida e energia gasta (RAMSEY *et al.*, 2010), o que conduz a um persistente ganho calórico (GUIMARÃES e TUDURY, 2006; HAMPER, 2016), sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças (TVARIJONAVICIUTE *et al.*, 2012a), como diabetes mellitus, danos osteoarticulares, afecções do trato respiratório, cardiovascular, urinário, neoplásicos, entre outros (GERMAN *et al.*, 2010).

Estudos realizados há mais de uma década já mencionavam a obesidade como uma pandemia para pessoas e animais domésticos (LUND *et al.*, 2005; LUND *et al.*, 2006). Segundo White *et al.* (2016), a ocorrência de cães com sobrepeso e obesos nos hospitais veterinários está próximo a 45%, sendo as causas deste distúrbio consideradas complexas e de origem multifatorial. Dentro das prováveis origens da obesidade pode-se incluir predisposição genética, doenças endócrinas, castração precoce e alguns fatores exógenos, como consumo excessivo de alimentos, composição da dieta, uso de medicamentos que levam a polifagia, ausência de atividade física, estilo de vida atual e fatores ambientais (ZORAN *et al.*, 2010). Algumas raças de cães apresentam incidência alta a obesidade, tais como Labrador Retriever, Boxer, Terrier Escocês, Shetland Sheepdog, Basset Hound, Cavalier King Charles Spaniel, Cairn Terrier, Cocker Spaniel, Dachshund e Beagle, o que indica fatores genéticos com grande importância no desenvolvimento da obesidade (LAFLAMME, 2015).

### 1.1 FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE

#### 1.1.1 Tecido adiposo

O tecido adiposo é formado pela integração entre adipócitos, matriz conectiva, tecido nervoso, células vasculares do estroma e células do sistema imune (KIL e SWANSON, 2010). Está envolvido em diversos processos biológicos do metabolismo energético, sendo responsável pela captação, processamento e armazenamento dos

lipídios circulantes (KERSHAW e FLIER, 2004). Além disto, expressa uma variedade de receptores de neurotransmissores e de diversos hormônios, relacionados com funções neuroendócrinas e imunológicas do organismo (CLARK e HOENING, 2016).

O tecido adiposo branco é considerado um órgão endócrino complexo com a capacidade de expressar e secretar uma variedade de peptídeos bioativos, denominados adipocinas (XU *et al.*, 2003; KURYSZKO *et al.*, 2016), como os hormônios adiponectina e leptina, que atuam por mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos (GOOSSENS, 2008). Em adição, o tecido adiposo dos cães é capaz de liberar inúmeras citocinas e quimiocinas pró inflamatórias como fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), entre outras (HAMPER, 2016). A obesidade tem sido implicada na desregulação da produção de adipocinas o que contribui para várias anormalidades metabólicas relacionadas à obesidade (KIL e SWANSON, 2010).

O TNF- $\alpha$  foi a primeira citocina identificada no tecido adiposo de roedores obesos e está relacionada com o conceito de inflamação metabólica e resistência insulínica em animais de laboratórios (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993) e em nível sérico em cães obesos (GERMAN *et al.*, 2009). Do mesmo modo, em humanos, existem fortes evidências de associações entre TNF- $\alpha$ , resistência insulínica e deposição ectópica de gordura observadas na obesidade. Evidenciou-se, por exemplo, que o TNF- $\alpha$  inibe fatores de diferenciação dos adipócitos e induz a apoptose, o que desencadeia o alargamento dos adipócitos remanescentes e altera a secreção das adipocinas, que também predispõem à resistência insulínica (GOOSSENS, 2008). Contudo, em cães, os estudos sobre essas associações são restritos.

Considerando a distribuição corporal do tecido adiposo, segundo Clark e Hoening (2016), existem algumas controvérsias se a gordura visceral ou subcutânea é mais importante no desenvolvimento da resistência à insulina, e a quantificação de gordura nesses locais e sua correlação com a sinalização de insulina tem sido área ativa de pesquisa. Existe a suposição de que a distribuição visceral leva a fluxo aumentado de adipocinas ocasionando aumento na atividade lipolítica, o que influencia negativamente a sinalização da insulina. Outra pesquisa realizada por Baldisserotto *et al.* (2013) sugere que a distribuição de tecido adiposo subcutâneo é mais crítica e gera alterações na sensibilidade à insulina, em parte devido ao seu maior volume.



Estudos conduzidos por Kabir *et al.* (2011) afirmam que os adipócitos da região visceral de cães obesos são maiores em relação aos do tecido subcutâneo e, esta hipertrofia representou fator preditivo para a resistência insulínica. Os diferentes depósitos de gordura corporal visceral e subcutâneo, assim como o tamanho dos adipócitos, estão diretamente relacionados com a produção de adipocinas e disfunções metabólicas em humanos e animais de laboratório (GOOSENS, 2008; LEE *et al.*, 2012; SHUSTER *et al.*, 2012; BONZÓN-KULICHENKO *et al.*, 2018).

Outro fator importante é, que em humanos, demonstrou-se que a expansão do tecido adiposo desencadeia quadro de hipóxia e apoptose celular, que são fatores de recrutamento dos macrófagos (GOOSSENS, 2008; CAO, 2014). A presença de macrófagos e leucócitos ativados ocasiona aumento na secreção de citocina em pessoas obesas (CAO, 2014), mas em cães estas informações não foram documentadas na literatura até o presente momento.

#### 1.1.2 Eixo hipotálamo, hipófise, adrenal

A obesidade ocasiona múltiplas alterações endócrinas em seres humanos e em roedores e, está associada a distúrbios dos principais eixos hormonais, como o eixo hipotalâmico hipofisário adrenal (HPA), gonadal, hormônio de crescimento (GH), fator 1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1). O aumento da gordura corporal em humanos está associado com o aumento da secreção de cortisol, insulina, IGF-1 e diminuição da secreção de GH, sendo estas informações descritas desde 1996 por Smith.

O excesso de gordura corporal está envolvido com a desregulação da produção das adipocinas, gerando resposta exacerbada denominada hiperreatividade do eixo HPA (KIL e SWANSON, 2010). Esta resposta anormal do eixo HPA pode estar relacionada com processos inflamatórios e, conseqüentemente, o estresse oxidativo (OLIVER *et al.*, 2010; TRAN *et al.*, 2012).

Roelfsema *et al.* (2009) afirmaram que em indivíduos obesos ocorre resposta anormal do eixo HPA e, que a provável origem está associada ao aumento da leptina em pessoas obesas, pois ocorre estímulo à produção de hormônios hipofisários e hipotalâmicos como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônio estimulante de corticotrofina (CRH) respectivamente. Estudos em humanos sugerem que as concentrações de cortisol são maiores em pacientes com obesidade em comparação

com indivíduos saudáveis, tanto em condições basais quanto nas avaliações dinâmicas (DUCLOS *et al.*, 2005; SEN *et al.*, 2008).

Esta resposta anormal do eixo HPA pode propiciar e agravar a produção de citocinas como TNF $\alpha$ , IL6 e IL-1 $\alpha/\beta$ . Do mesmo modo, as citocinas produzidas como parte da resposta imune adaptativa, tais como a interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) também estão relacionadas com o aumento da produção de cortisol pelo eixo HPA. Em humanos, estas citocinas atuam não só no hipotálamo para aumentar a liberação de CRH, mas na hipófise e glândulas adrenais, o que gera maior resposta de ACTH e cortisol, respectivamente, na circulação (RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

Existem diversas evidências, em humanos, de que há maior ativação do eixo HPA em pacientes obesos, particularmente naqueles com distribuição central de gordura. Pasquali *et al.* (1993), descreveram um dos primeiros estudos e, demonstraram que mulheres com obesidade central apresentaram aumento significativo de cortisol e ACTH após estímulo com CRH, em relação a controles não obesas ou mulheres com obesidade periférica. Segundo Lordelo *et al.* (2007), ocorre maior frequência na liberação dos pulsos de ACTH, com menor amplitude de pulso, mantendo o nível basal normal e, os adipócitos viscerais possuem maior densidade de receptores de glicocorticóides que os adipócitos do tecido adiposo periférico.

Pasquali *et al.* (2006) afirmaram que pessoas com obesidade visceral possuem número mais elevado de receptores de cortisol nos adipócitos abdominais, o que favorece aumento da ação de cortisol intracelular e o desenvolvimento de síndrome metabólica (resistência a insulina, dislipidemias e hipertensão).

Masuzaki *et al.* (2001), relacionaram de forma direta os glicocorticóides nos adipócitos como fatores-chave da obesidade e da doença metabólica. Estudos com ratos obesos comprovaram aumento da atividade glicocorticóide na gordura abdominal, estes pesquisadores demonstraram aumento da atividade da 11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 1 (11 $\beta$ HSD-1) no tecido adiposo omental, acarretando em maior geração de glicocorticóide local, e conseqüentemente maior ativação de seu receptor, promovendo obesidade (LIVINGSTONE *et al.*, 2000). Seckl (2004), afirmou que o aumento da atividade da 11 $\beta$ HSD-1 no tecido adiposo de roedores está relacionado com elevadas concentrações de glicocorticóides nos adipócitos.

Embora a hiper-reatividade no eixo HPA já seja documentada há muitos anos em humanos (GUILLAUME-GENTIL *et al.*, 1990), na medicina veterinária existem

poucos estudos. Martin *et al.* (2006) publicaram um estudo com cães obesos, e concluíram que a hiper-reatividade do eixo HPA ocorreu em apenas quatro de 31 cães, concordando com Gayet *et al.* (2004) que estudou as modificações que ocorrem após o ganho de peso corporal e, demonstrou que o cortisol plasmático basal permaneceu inalterado durante o período de aumento de peso. Soder *et al.* (2016), investigaram e observaram uma maior relação cortisol/creatinina na urina de cães com sobrepeso em jejum e, afirmaram que embora os cães com excesso de peso pareçam saudáveis, os resultados deste estudo mostraram que alterações metabólicas podem estar presentes. Enfatizaram a necessidade de mais estudos sobre o papel do cortisol na obesidade em cães.

### 1.1.3 Hormônio tireoidiano e obesidade

A relação entre obesidade e tireóide é complexa. Na literatura, está bem estabelecido que a disfunção nesta glândula (hipotireoidismo ou hipertireoidismo) resulta em alterações no peso corporal devido à participação de hormônios tireoidianos no controle da termogênese e do apetite. No entanto, algumas pesquisas mostraram que o excesso de peso também pode influenciar na função da tireóide, ocasionando aumento na secreção do hormônio estimulante da tireóide (TSH), com ou sem alterações nas concentrações da triiodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4). No entanto, não é possível estabelecer se essas alterações na função da tireóide são primárias ou secundárias à obesidade (SANTINI *et al.*, 2014).

A etiologia dessas mudanças no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide na obesidade ainda não está clara. No entanto, vários mecanismos foram propostos, dentre os quais os relacionados ao processo de adaptação para aumentar o gasto energético, as mudanças na atividade das desidrase, a presença de resistência central ou periférica aos hormônios tireoidianos, a inflamação crônica de baixo grau e presença de resistência à insulina (FONTENELLE *et al.*, 2016).

Frente ao importante papel dos hormônios tireoidianos na regulação da termogênese, a dinâmica do eixo hipotálamo-hipófise-tireoidiano na obesidade já foi estudada em humanos e animais de laboratório (SANTINI *et al.*, 2014; PANVELOSKI-COSTA *et al.*, 2018). Em gatos obesos foi realizado um único estudo por Ferguson *et al.* (2007), que concluíram que o desenvolvimento da obesidade no gato está associado a um aumento significativo da tiroxina livre (T4L) dentro da faixa de

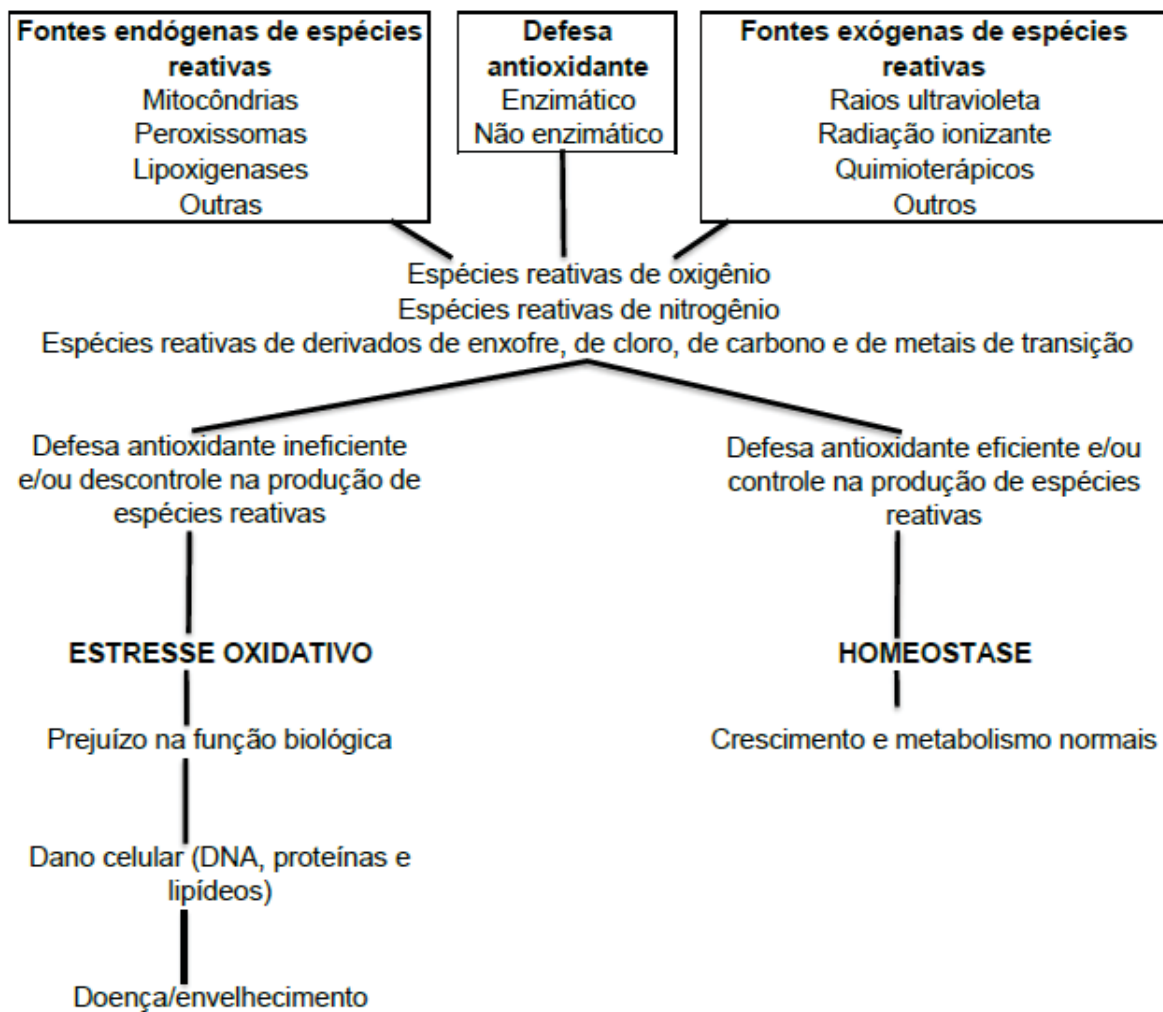
referência normal. Em cães os estudos são restritos e escassos conforme Martin *et al.* descreveu em 2006.

#### 1.1.4 Estresse oxidativo, resistência insulínica e obesidade

O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio causado pelo excesso na produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) associado à queda na capacidade antioxidante celular (SIES, 1997; FINKEL e HOLBROOK, 2000; SCANDALIOS, 2005). Os sistemas de defesa antioxidante são divididos em não-enzimático (SANE) e enzimático (SAE). Fazem parte do SANE pequenas moléculas como vitaminas C e E (WISEMAN e HALLIWELL, 1996; NORDBERG e ARNÉR, 2001; SCANDALIOS, 2005). O SAE é constituído principalmente por três enzimas: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Estas enzimas oferecem proteção ao organismo por promover a remoção do radical superóxido ( $O_2^-$ ) e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), convertendo-os em espécies menos reativas (FINKEL, 2003; SCANDALIOS, 2005).

Quando este sistema atua de forma ineficiente ou ocorre superprodução de radicais livres, o estresse oxidativo se instala (FIGURA 1). Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos, podendo ocasionar danos no ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA) das biomoléculas e, conseqüentemente afetar a saúde humana e animal (BARREIROS e DAVID, 2006).

**FIGURA 1** – Mecanismo de ocorrência do estresse oxidativo. Os sistemas de defesa antioxidante, quando eficientes, mantêm a homeostase e quando ineficientes, permitem a instalação do estresse oxidativo com dano celular e prejuízo na função biológica.



FONTE: Adaptado de Vasconcelos *et al.*, 2007.

A obesidade pode ocasionar estresse oxidativo sistêmico devido a múltiplos mecanismos bioquímicos, como a produção de íons superóxido, NADPH oxidase (NOX), fosforilação oxidativa, oxidação de gliceraldeído, ativação da proteína quinase C (PKC), assim como da via do poliol e hexosamina (SAVINI *et al.*, 2013; SERRA *et al.*, 2013).

Outros fatores que também contribuem com o estresse oxidativo na obesidade incluem hiperleptinemia, disfunções teciduais, baixa defesa antioxidante, inflamações crônicas e geração de EROs pós-prandial (MANNA e JAIN, 2015). Abbasiana *et al.* (2018) afirmam que na síndrome metabólica em humanos, associados com hiperglicemia e inflamação podem levar ao aumento da produção de EROs e estas têm efeitos tóxicos que levam à peroxidação dos lipídios da membrana

e produzem malondialdeído (MDA). Conforme Manna e Jain (2015), em humanos, o aumento dos ácidos graxos livres intracelulares promovem uma redução da translocação de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT-4), o que conduz à resistência insulínica. Segundo Brennan e Hoenig (2004), gatos obesos possuem expressão de GLUT-4 diminuída, assim como em humanos.

Cline *et al.* (2009), realizaram um estudo com cães obesos em que a avaliação do estresse oxidativo foi realizada pela mensuração dos concentrações de glutathiona e foi observada redução da concentração de glutathiona dos animais obesos quando comparado a cães eutróficos, o que demonstrou fortes evidências de que os animais obesos apresentam uma diminuição da capacidade antioxidante.

Além disso, o excesso de EROs no tecido adiposo faz com que a expressão de adiponectinas seja diminuída, contribuindo então para o desenvolvimento de resistência a insulina em humanos (FURUKAWA *et al.*, 2004). Cline *et al.* (2009) afirmaram que o estresse oxidativo causa dano ao DNA com subsequente alteração na expressão dos genes, na sinalização celular, mutações, transformação celular e morte celular e, estes efeitos podem predispor a inúmeras afecções. Sabe-se que na medicina veterinária, o estresse oxidativo pode ocasionar resistência à insulina e levar ao desenvolvimento de diabetes (LAFLAMME, 2015), no entanto, os estudos em cães são escassos.

Os mecanismos para o desenvolvimento da resistência à insulina relacionados à obesidade, são caracterizados por alterações em etapas da sinalização da insulina, apresentando redução na concentração da atividade quinase do receptor de insulina (IR), da fosforilação de tirosina em substratos 1 e 2 do receptor de insulina ( IRS-1 e IRS-2) e redução da atividade de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q). Entretanto, a fosforilação de IRS-1 pode ser tanto em tirosina e subsequente fosforilação de PI3q como em resíduos de serina, onde algumas proteínas inflamatórias podem promover esta alteração e assim comprometer a atividade de PI3q e translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática (MAYER e BELSHAM, 2010; CASTRO *et al.*, 2013).

O excesso de ácidos graxos livres (AGL) afeta diretamente o metabolismo celular. Os AGL circulantes ativam proteínas de membrana plasmática denominados *toll like receptors 4* (TLR-4), desencadeando a ativação de vias inflamatórias que vão interferir na captação de glicose pela sinalização da insulina. Portanto, os AGL, ao se

ligarem ao receptor TLR-4 na membrana celular ativam *c-jun N-terminal kinase* (JNK) (DASU e JIALAL, 2010; RADA *et al.*, 2018).

Porém, os AGL também ativam a sinalização de outra via inflamatória que possui relação negativa com a sensibilidade à insulina, pois ao se ligarem ao receptor TLR-4 induzem a ativação da quinase inibidora do fator nuclear Kappa B (ikK). Após ser ativada, a ikK pode diretamente fosforilar IRS-1 em resíduos de serina, atenuando a atividade de tirosinas ou/e ativação de ikK leva a fosforilação de inibidora do fator nuclear kappa B (ikKB) e, são formadas cadeias de poliubiquitinas que vão induzir a degradação proteossomal de ikKB, sendo um inibidor de fator nuclear de transcrição kappa B (NF-kB). Com a degradação de ikKB ocorre subsequente aumento da expressão de NF-kB que vai agir no núcleo celular se ligando ao DNA e portanto, induzindo a transcrição gênica de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6 (BARMA *et al.*, 2009).

O mecanismo em que TNF- $\alpha$  induz o desenvolvimento de resistência a insulina está na ligação de TNF- $\alpha$  aos seus receptores na membrana plasmática, TNFR1 e TNFR2, sendo capaz de ativar também as proteínas inflamatórias ikK e JNK. Assim, dando sequência na resposta inflamatória causada por estas moléculas (VALEDO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2018).

#### 1.1.5 Parâmetros renais na obesidade

A obesidade em humanos é considerada fator de risco ao desenvolvimento e progressão de doença renal crônica (TVARIJONAVICIUTE *et al.*, 2013; WEETH, 2016), as alterações glomerulares relacionadas à obesidade caracterizam-se por vasodilatação da arteríola aferente, hipertensão e hiperfiltração glomerular. A expressão clínica da hiperfiltração glomerular nos obesos é a presença de microalbuminúria ou proteinúria. Também ocorre aumento da reabsorção de sódio nos segmentos proximais do néfron, além de maior atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (PAULA *et al.*, 2006; GUEDES *et al.*, 2010).

Em humanos obesos ocorre aumento da produção de angiotensinogênio pelos adipócitos, resultando em uma maior concentração de angiotensina II circulante, que promove a vasoconstrição, e maior concentração de aldosterona, acarretando retenção renal de sódio (ZORAN *et al.*, 2010). A estas alterações somam-se os distúrbios metabólicos e estes achados interligam a obesidade com a lesão renal



(PAULA *et al.*, 2006). Além disso, esta maior atividade do SRAA gera uma hipertensão arterial sistêmica em humanos que, inicialmente, é uma consequência da doença renal, mas a longo prazo gera perda do tecido renal funcional (WEHNER *et al.*, 2008), pois a hipertensão glomerular gera perda protéica pelos capilares glomerulares e, glomeruloesclerose (ETTINGER e FELDMAN, 2010). Tvarijonavičiute *et al.* (2013) comprovaram que a redução da gordura corporal pode reverter muitas manifestações clínicas associadas à nefropatias, entretanto tais eventos ainda não foram completamente estudados e evidenciados na espécie canina.

Heneger *et al.* (2001) induziram a obesidade experimentalmente em cães e comprovaram aumento da pressão arterial média e maior atividade da renina plasmática, o que alterou a função renal e causou alterações histológicas na arquitetura renal, como expansão da cápsula de Bowman, proliferação celular nos glomérulos, espessamento da membrana basal glomerular e tubular e, aumento da matriz mesangial, o que ocasionou proteinúria patológica.

O termo proteinúria se refere a uma quantidade anormal de proteína na urina detectada por testes semiquantitativos ou quantitativos. Uma vez que esta alteração é identificada faz-se necessário verificar sua origem, persistência e magnitude (LEES *et al.*, 2005; CIANCIOLO *et al.*, 2016). A proteinúria pode ser classificada de acordo com sua origem em pré-renal, renal ou pós-renal, sendo que a proteinúria renal pode ser classificada em funcional ou patológica. A proteinúria renal patológica causa perda protéica persistente pela urina (ETTINGER e FELDMAN, 2010), identificada a partir de duas a três coletas de urina com intervalo mínimo de 15 dias (CORTADELLAS *et al.*, 2009). Este é um indicativo de doença renal crônica antes do desenvolvimento de azotemia (JACOB *et al.*, 2003; GRAUER, 2007).

A microalbuminúria, por outro lado, é observada quando a taxa de excreção de albumina pela urina está aumentada, não sendo detectada por procedimentos laboratoriais padrões. Isto significa que a taxa de excreção de albumina está acima do nível normal, mas abaixo do nível proteinúrico (REGO, 2006). Em cães, a microalbuminúria é definida como concentração de albumina maior do que 1 mg/L na urina (GRAUER, 2011). Em geral, ela precede a proteinúria (MURGIER *et al.*, 2009) e, pode ser utilizada como marcador da fase inicial de doença renal e cardiovascular em seres humanos, e está associada a disfunções subclínicas renais e sistêmicas em cães (LIEN *et al.*, 2010). Este parâmetro é um excelente marcador de doença renal

precoce e de alteração da permeabilidade glomerular (TVARIJONAVICIUTE *et al.*, 2013).

Uma vez que a proteinúria é considerada marcador de lesão renal, a redução de sua intensidade se mostra benéfica, principalmente nos estágios iniciais da doença renal crônica (WAKI *et al.*, 2010). Apesar da proteinúria ser importante marcador de lesão renal, em muitas situações este exame não é a primeira escolha do clínico, sendo assim, os marcadores séricos, como a creatinina, continuam sendo ferramentas indispensáveis na clínica de pequenos animais para identificação de afecções renais. No entanto, o aumento da concentração de creatinina sérica e instalação da azotemia só ocorrem quando 50% ou mais dos néfrons estão acometidos (CIANCIOLO *et al.*, 2016).

Estudos conduzidos em cães e gatos identificaram nos últimos anos o uso da dimetilarginina simétrica (SDMA) como biomarcador da função renal endógena, visto que tende a acumular em pacientes com disfunção renal e possibilita a detecção precoce de alterações na taxa de filtração glomerular (TFG) (BRAFF *et al.*, 2014; HALL *et al.*, 2014; BROWN, 2015; HALL *et al.*, 2016a). Em estudo realizado com cães portadores de nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X, demonstrou-se que as concentrações da SDMA aumentam durante a progressão da forma pré-clínica até o estágio final da doença renal, com boa correlação com o aumento da creatinina e diminuição da TFG (NABITY *et al.*, 2015).

Um valor de corte da SDMA de 14 µg/dL identifica em média uma redução de 49% da TFG de cães, em uma média de 9,8 meses (variação de 2,2 a 27 meses) antes do aumento sérico da creatinina (HALL *et al.*, 2016a). Da mesma forma, observou-se o aumento deste biomarcador em gatos cerca de 17 meses antes da elevação da creatinina (variação de 1,5 a 48 meses) (HALL *et al.*, 2014). Assim, a mensuração da SDMA permite a detecção precoce de alteração na TFG em relação à creatinina sérica, em animais com injúria renal.

A SDMA não sofre interferência de dietas hiperproteica e tão pouco de alterações da massa corporal magra, como acontece com a creatinina sérica em cães (HALL *et al.*, 2015), bem como é menos afetada pelo nível de desidratação corporal, em comparação à creatinina (GUESS, 2016). Além disso, a avaliação da TFG pode ajudar a avaliação da função renal de animais com poliúria e polidipsia, bem como no esclarecimento das imprecisões e variações não-renais associadas com a mensuração da creatinina (RELFORD *et al.*, 2016).

Além da relação com a TFG, tem-se investigado o papel patofisiológico da SDMA no desenvolvimento de complicações sistêmicas. Inicialmente, acreditava-se que a SDMA não representava um fator patológico, de tal modo que o foco foi direcionado para o papel do acúmulo da dimetilarginina assimétrica (ADMA), visto que essa inibe a enzima óxido nítrico sintase e, está associada com maior risco de doenças cardiovasculares, hipertensão e mortalidade (SCHWEDHELM e BÖGER, 2011; TAIN e HSU, 2017). Entretanto, recentemente demonstrou-se que a SDMA prediz de forma mais consistente a progressão da doença renal crônica (DRC) e eventos cardiovasculares do que a ADMA (EMRICH *et al.*, 2018). No caso, a SDMA também inibe o sistema do óxido nítrico (NO), a partir da competição com a L-arginina, que é substrato para formação do NO, predispondo à inflamação vascular, aumento da resistência vascular e diminuição da perfusão renal (EMRICH *et al.*, 2018; TAIN e HSU, 2017).

## 2 JUSTIFICATIVAS

Devido a crescente frequência nas últimas décadas da obesidade em cães, investigamos prováveis complicações deste distúrbio metabólico como a relação entre o eixo hipotálamo hipófise adrenal, produção de citocinas capazes de promover inflamação e estresse oxidativo, com produção de radicais livres, e ocasionar inúmeras consequências na funcionalidade dos leucócitos, como fator extrínseco em doenças inflamatórias crônicas, degenerativas, endócrino-metabólicas e neoplásicas.

Existem também evidências de que a obesidade é um fator de progressão da doença renal crônica, entretanto, os estudos são escassos na literatura mundial que comprove a progressão nos animais da espécie canina em condições de obesidade, assim como não foi avaliado ainda, de forma crítica em cães obesos, a peroxidação lipídica e as características morfológicas do tecido adiposo, a atividade do eixo hipotálamo hipófise adrenal, bem como se esta é capaz de gerar estresse oxidativo e favorecer o desenvolvimento de síndrome metabólica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo apresenta como objetivo geral a avaliação de marcadores metabólicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em cadelas obesas e suas alterações após programas de perda de peso.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar alterações estruturais, quantitativas dos adipócitos e a presença de infiltrado leucocitário no tecido adiposo de cães obesos;
- Avaliar a imunoexpressão do TNF- $\alpha$  no tecido adiposo;
- Avaliar a atividade do eixo hipotálamo hipófise adrenal, as concentrações de tiroxina livre no plasma, a insulina sérica e sensibilidade periférica, peroxidação lipídica no plasma e marcadores de alterações precoces na função renal em cadelas obesas, antes e após emagrecimento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO DA PRIMEIRA ABORDAGEM

O estudo foi conduzido com animais atendidos na rotina da Clínica Veterinária Escola (CVE) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), localizada em Curitiba, Paraná, sob aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais da PUCPR (protocolo 805 – ANEXO A). Um total de 30 animais foram investigados e 17 obtiveram os critérios de inclusão.

#### 4.1.1 Animais

Foi realizado estudo caso-controle, em que foram selecionadas cadelas íntegras, adultas, de variadas raças, candidatas à ovariosalpingohisterectomia eletiva que, ao exame clínico completo apresentaram-se sem sinais clínicos de doenças concomitantes, como: doenças odontológicas, dermatológicas, cardiorrespiratórias, neurológicas, ortopédicas, urogenitais, gastrointestinais, autoimunes, neoplasias e outras doenças endócrinas. Ainda, foram excluídos cães que fizeram uso de antibióticos, corticóides e anti-inflamatórios até três meses antes da inclusão no projeto e cadelas que fizeram uso de contraceptivos injetáveis ou orais pelo prazo de seis meses antes da inclusão no projeto.

Os animais foram submetidos à classificação do escore de condição corporal (ECC), um parâmetro validado e proposto por Laflamme (1997) para avaliar a condição corporal em cães que é baseado na inspeção e palpação do paciente, empregando escalas numéricas (ANEXO B).

A partir desta triagem inicial, foram criados 2 grupos:

**Grupo Obesas** – constituído por 9 fêmeas íntegras, com escore corporal 9/9 (LAFLAMME, 1997);

**Grupo Controle** – 8 fêmeas íntegras, com condição corporal eutrófica, com ECC 5/9 (LAFLAMME, 1997).

#### 4.1.2 Exames complementares

Exames sanguíneos de triagem (hemograma e análises bioquímicas séricas de albumina, alanino aminotransferase, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, glicose, triglicerídeos e colesterol – ANEXO C) foram realizados, sob jejum alimentar de 12 horas. As amostras sanguíneas foram obtidas por venopunção jugular, por meios assépticos, armazenadas em frascos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ativador de coágulo e, posteriormente processadas no laboratório de análises clínicas da CVE da PUCPR.

Todos os animais foram submetidos ao procedimento de ovariossalpingohisterectomia eletiva, no qual foram coletados fragmentos de tecido adiposo subcutâneo e visceral, com aproximadamente 2 centímetros cúbicos por meio de incisão da região próxima à linha alba (subcutânea) e do ligamento falciforme (visceral), respectivamente, conforme demonstra a FIGURA 2. As amostras foram acondicionadas em formalina 10% e processadas de acordo com a histotécnica de rotina do Laboratório de Histopatologia da CVE da PUCPR, com inclusão em parafina e secção em micrótomo em cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura. As lâminas de cada amostra dos tecidos adiposos foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), das quais foram obtidas imagens digitalizadas com o scanner Zeiss Axio Scan.Z1<sup>®</sup> (Carl Zeiss), com objetiva de 20x, para avaliação morfométrica (diâmetro e número dos adipócitos – FIGURA 3) e histológica (infiltrado leucocitário tecidual).

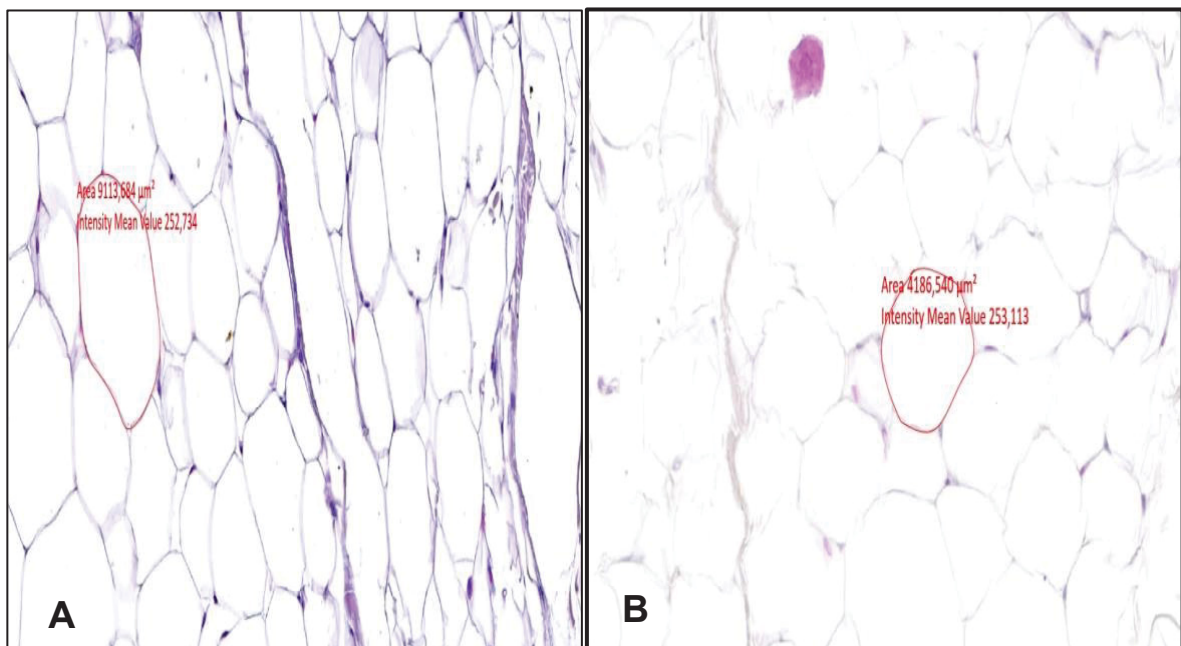
**FIGURA 2** – Coleta de tecido adiposo visceral, feita por técnica excisional com retirada do ligamento falciforme em uma cadela do grupo obesas.





As imagens foram avaliadas por dois avaliadores as cegas. Os mesmos não possuíam o conhecimento de qual grupo de animais correspondiam. Após as imagens foram analisadas com o *software* ZEN (Zeiss Microscope software). Para mensuração do diâmetro adipocitário, foi delimitada uma área aleatória do tecido adiposo e realizada a delimitação manual do tamanho de 50 adipócitos de cada região, subcutânea e visceral, de cada animal e calculada a média final dos valores obtidos (FIGURA 3). A avaliação de infiltração leucocitária, classificada em presença ou ausência de infiltrado, considerou como presença a partir da identificação de um único leucócito. Posteriormente, também foi delimitada outra área aleatória de 200 milímetros quadrados de cada região, subcutânea e visceral, de cada animal, na qual foi realizada a contagem do número de adipócitos, excluindo as células da borda das imagens.

**FIGURA 3** – Imagens de histopatologia, coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) com amplificação de 10x, demonstrando a mensuração dos adipócitos com o *software* Zen (Zeiss Microscope). **a)** Tecido adiposo subcutâneo de um animal do grupo obeso. **b)** Tecido adiposo subcutâneo de uma cadela do grupo controle.



Para avaliação imunohistoquímica, inicialmente as amostras emblocadas foram remanejadas de acordo com a técnica de *Tissue Microarray* (TMA), descrita por Mattioli *et al.* (2011). Para tal, uma broca metálica de cinco milímetros de diâmetro foi utilizada para colher fragmentos cilíndricos das amostras, e novos blocos de parafina

foram confeccionados agrupando os tecidos adiposos de ambos os grupos de forma aleatória e às cegas.

Os blocos de TMA foram seccionados em cortes de 4  $\mu\text{m}$  e acondicionados em lâminas eletricamente carregadas. Os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5% em metanol) por 15 minutos. *Target Retrieval Solution TM* (Dako, Glostrup, Dinamarca) foi utilizado para recuperação antigênica induzida por calor de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram incubadas com o anticorpo anti-TNF-alfa ABCAM/ABD6671, na diluição de 1:50 em solução tampão fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline – PBS*), “overnight” em geladeira. Como controle negativo, a adição do anticorpo foi substituída pelo uso de tampão fosfato salino. O anticorpo secundário, Advance<sup>TM</sup> (Dako, Glostrup, Dinamarca) foi aplicado por 15 minutos de acordo com as instruções do fabricante. As imunorreações foram visualizadas depois de incubar as amostras com cromógeno DAB (OriGene, Rockville, MD, EUA), e em seguida contracorar-las utilizando Hematoxilina de Harris.

As lâminas foram digitalizadas com o scanner Zeiss Axio Scan.Z1<sup>®</sup> (Carl Zeiss), com objetiva de 20x, e avaliadas com o *software* ImagePro-Plus (versão 4.5.0.29 para Windows 98/Nt/2000). Para tanto, foi selecionada uma média de 30 imagens de cada região, de cada animal, excluindo tecidos com vasos sanguíneos e amplo tecido intersticial. Com o *software* foram criadas máscaras quanto à positividade e negatividade imunohistoquímica na área total da imagem, que foram aplicadas em todas as imagens. Ao final foram realizadas médias quanto à positividade em porcentagem de cada animal.

#### 4.1.3 Análises estatísticas

Na estatística, os dados foram analisados usando o *software* STATA na versão 14 (College Station, Texas, EUA). O nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ). As distribuições de frequência de animais incluídos neste estudo foram calculadas para dados demográficos. A imunoexpressão de TNF- $\alpha$ , tamanho de adipócitos e número de adipócitos nos tecidos subcutâneo e visceral foram comparados entre os dois grupos de animais pelo teste Mann Whitney; enquanto a proporção média de infiltrado de leucócitos em ambos os tecidos foi comparada com Qui-quadrado.

A correlação entre a imunexpressão de TNF- $\alpha$  no tecido subcutâneo e visceral, em ambos os grupos de estudo, foi analisada de forma não paramétrica utilizando a correlação de Spearman. As correlações foram número de adipócitos, tamanho de adipócitos e infiltrado de leucócitos com TNF- $\alpha$ , em ambos os tecidos subcutâneo e visceral de cada grupo.

## 4.2 DELINEAMENTO DA SEGUNDA ABORDAGEM

Este estudo foi um estudo prospectivo e longitudinal, realizado com animais da rotina de atendimento da CVE da PUCPR, localizada em Curitiba, Paraná, Brasil. O presente estudo foi aprovado e conduzido de acordo com as recomendações do Comitê de Ética para Uso de Animais da PUCPR (protocolo 805). Um total de 23 animais foram investigados e 10 apresentaram os critérios de inclusão.

### 4.2.1 Animais

Foram incluídos neste estudo 10 cadelas obesas há pelo menos 1 ano, adultas, castradas, de variadas raças, não azotêmicas, com peso máximo de 15 kg. As pacientes obesas incluídas no estudo foram submetidas ao exame clínico completo, pesagem e foram classificadas pelo ECC proposta por Laflamme (1997) em obesas (ANEXO B), em que foram detectados depósitos maciços de gordura sobre o tórax, coluna vertebral, base da cauda, pescoço e membros, além de cintura ausente e distensão abdominal evidente, sendo esta descrição compatível com pontuação 8 e 9/9 (FIGURA 4).

**FIGURA 4** – Cadelas obesas com escore corporal (ECC) 9/9, incluídas no estudo.



Após a classificação da ECC as pacientes foram submetidas a determinação do índice de massa corporal canina (IMCC) que foi calculado utilizando a adaptação feita por Muller *et al.* (2008) com o uso da fórmula: peso corporal (kg)/estatura em m<sup>2</sup>, sendo a estatura o comprimento entre a base da nuca e o solo imediatamente atrás dos membros posteriores (FIGURA 5), considerando o IMCC ideal para cães de porte médio entre 11,0 e 15,0. A porcentagem de gordura corporal (%GC) foi realizada seguindo o descrito por Burkholder e Toll (2000), com a equação:

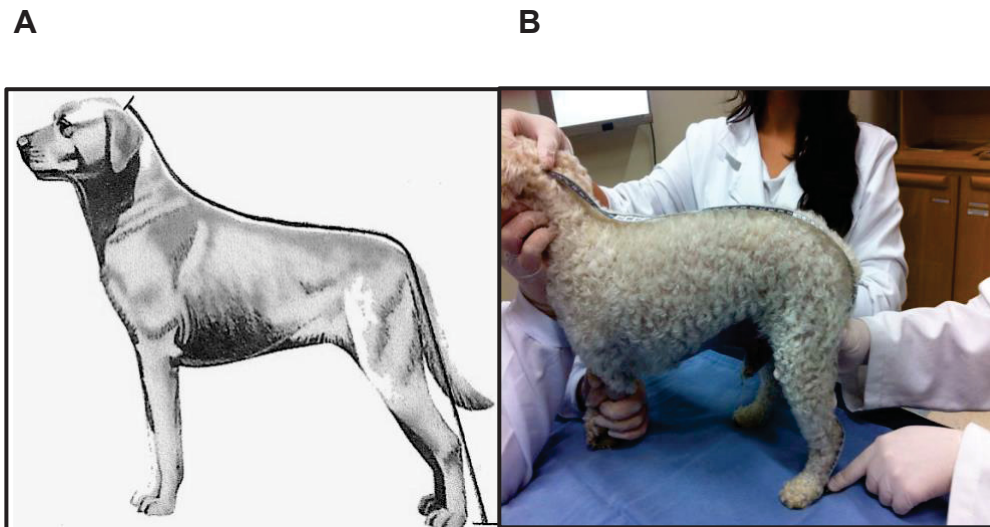
$$\%GC = (-1,7 \times \text{membro pélvico cm}) + (0,93 \times \text{perímetro abdominal cm}) + 5.$$

Sendo consideradas sobrepeso com 10 a 19% de %GC e obesas acima de 20%.

Os animais incluídos no projeto, foram submetidos a exames complementares, sendo neste momento classificados como tempo 0 (zero). Os exames realizados foram hemograma; análises bioquímicas sanguíneas (albumina, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinina, uréia, triglicerídeos, colesterol, fibrinogênio, frutossamina e glicose – ANEXO D), urinálise e pressão arterial sistólica. Para tal, os cães foram submetidos à coleta das amostras sob jejum alimentar de 12 horas. O sangue foi obtido por venopunção jugular, as amostras foram acondicionadas

em frascos apropriados e posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas da CVE da PUCPR para processamento e armazenamento do soro a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**FIGURA 5** – Obtenção da estatura do cão para o cálculo do índice de massa corporal canino (IMCC). **a)** Linha preta representa o trajeto da fita métrica sobre a coluna até o limite plantar do membro posterior, adaptado de Muller *et al.*, 2008. **b)** Paciente da rotina clínica realizando a medida da altura para o cálculo de IMCC.



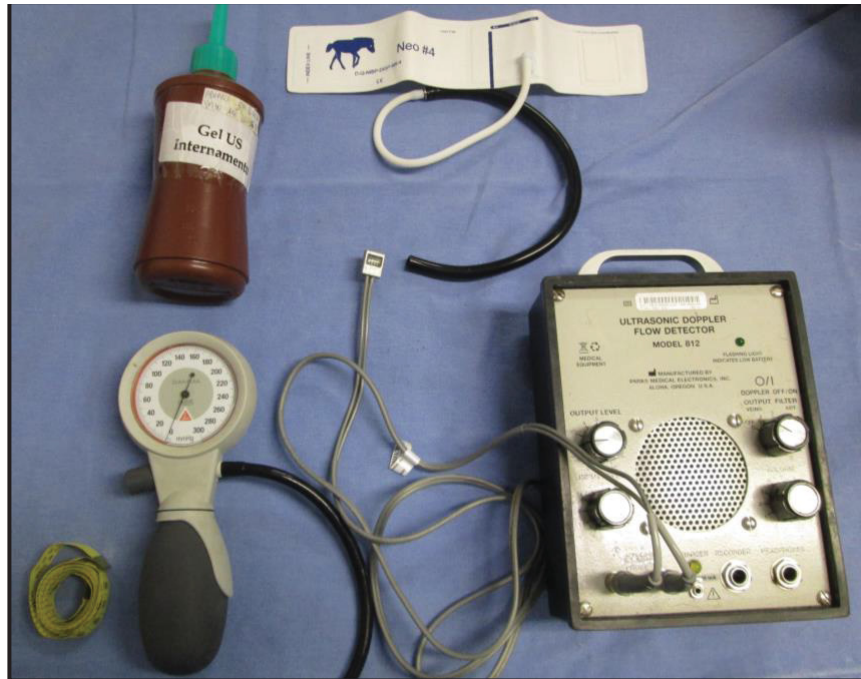
As amostras de urina foram coletadas por cistocentese, avaliadas quanto as suas características físicas e químicas, bem como avaliadas e quantificadas quanto à presença de sedimentos., de acordo com as técnicas estabelecidas no laboratório de Patologia Clínica da CVE da PUCPR.

Os animais foram submetidos à avaliação da pressão arterial sistólica, mensurados em ambiente calmo como o primeiro procedimento do dia, com o uso de Doppler (Doppler Ultrasound Parks Medical® Model 811B) e manguitos de tamanhos que variavam conforme a circunferência do membro torácico (FIGURA 6). Para cada

ção de ambos os grupos foram realizadas, no mínimo, três mensurações consecutivas em ambiente calmo, sendo registrada e considerada a média destas. Foram consideradas hipertensas as cadelas que apresentaram pressão arterial sistólica igual ou superior a 150 milímetros de mercúrio (mmHg).



**FIGURA 6** – Equipamentos necessários para mensuração indireta da pressão arterial sistólica em cães.



Todos os animais incluídos no estudo foram submetidos a exames ultrassonográficos para medida da camada adiposa do tecido subcutâneo em região de sétima vértebra lombar (L7). Para esta medida foi utilizado um transdutor linear de 7,5 megahertz em plano transversal, conforme descrito por Morooka *et al.* (2001).

Após a inclusão no estudo, todos os animais foram submetidos a um programa de perda de peso (PPP) com dieta hipocalórica fornecida duas vezes ao dia. A quantidade de alimento fornecida foi calculada conforme descrito por Carciofi *et al.* (2005) e o PPP foi realizado por um período total de dois meses.

A necessidade energética diária seguiu a formula abaixo:

$$\text{Necessidade energética diária (Kcal)} = (\text{Peso meta})^{0,75} \times 75 \text{ Kcal.}$$

Sendo que o peso meta foi determinado como 20% a menos do peso atual.

A dieta hipocalórica instituída possuía energia metabolizável de 2.870 Kcal/kg, proteína bruta mínima de 280 g/kg, matéria fibrosa máxima de 182 g/kg, taurina mínima de 2.070 mg/kg, L-carnitina mínima de 300 mg/kg e vitaminas (A, C, E, D3, B1, B2, B6, B12). Os proprietários recebiam a cada 15 dias os alimentos, que eram pesados e divididos em porções necessárias para cada refeição.



Após dois meses (tempo 1) de PPP, todos os animais foram submetidos aos mesmos exames morfológicos, ultrassonográficos e laboratoriais realizados no tempo 0 (ANEXO E).

Foram excluídas do projeto cadelas com outras comorbidades como: doenças dermatológicas, cardiorrespiratórias, neurológicas, ortopédicas, urogenitais, gastrintestinais, autoimunes, neoplásicas e com outras doenças endócrinas como hipotireoidismo e hiperadrenocorticismos. Também foram excluídas cadelas que fizeram uso de antibióticos, corticóides, anti-inflamatórios, pelo prazo de três meses antes da inclusão no projeto e também 3 proprietários que não aderiram ao PPP.

#### 4.2.2 Avaliação do eixo hipotálamo, hipófise, adrenal

O eixo HPA foi avaliado a partir de um teste dinâmico, o teste de estimulação com hormônio ACTH (Synacthen Depot<sup>®</sup>, Novartis). Esse teste consiste na mensuração do cortisol plasmático basal e após duas horas da administração intramuscular de 5 µg/kg de ACTH sintético de depósito (SIEBER-RUCKSTUHL *et al.*, 2015; ALDRIDGE *et al.*, 2016). Todos os testes foram realizados no período da manhã em ambos os tempos 0 e 1.

As amostras de sangue foram centrifugadas e logo após as amostras de soro foram congeladas à -70°C e encaminhadas mensalmente em compartimento refrigerado com gelo seco para o Laboratório Provet em São Paulo – Brasil, utilizando transporte aéreo e, o cortisol foi mensurado por técnica padrão de radioimunoensaio.

#### 4.2.3 Avaliação do hormônio tireoidiano

Em todos os animais foram mensurados T4L por diálise de equilíbrio por radioimunoensaio antes e após o PPP. As amostras de soro congeladas à -70°C, foram encaminhadas em compartimento refrigerado com gelo seco para o Laboratório Provet em São Paulo – Brasil, utilizando transporte aéreo.

#### 4.2.4 Avaliação da peroxidação lipídica e insulina

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada pela quantificação das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) realizada por meio de

reagente comercial (TBARS Assay Kit, Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, Michigan, EUA). Todas as amostras de soro analisadas foram armazenadas por um período máximo de 30 dias, armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , e o procedimento para a realização do teste foi feito conforme as recomendações do fabricante. As absorbâncias (540 mn) das reações foram obtidos no leitor ELISA (Biochrom Asys Expert Plus®, Cambridge, UK – FIGURA 7). A curva padrão foi desenvolvida em duplicatas com concentrações finais foram de 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 25 e 50  $\mu\text{m}$ , conforme descrito por Silva *et al.* (2013).

**FIGURA 7** – Leitor de ELISA Biochrom Asys Expert Plus®, Cambridge, UK.



A avaliação da concentração sérica de insulina foi realizada em duplicata com o *kit* comercial (Mercodia Canine Insulin ELISA), método imunoensaio validado por Oberg *et al.* (2011) e utilizado por Tvarijonaviciute *et al.* (2012a). A técnica foi realizada conforme descrição abaixo: a- foi separado 50 mL de calibrador, de controle e da amostra nos poços e pipetado 50 mL do conjugado anti-ins-hrp em todos os poços, seguido da incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente; b- em seguida, foi aspirado o líquido de cada poço e lavado a placa por três repetições, utilizando 0,4 mL da solução de lavagem em cada poço; c- após 15 minutos do processo de lavagem, foi pipetado 100 mL da solução cromogênica e incubado a placa de microtítulo em temperatura ambiente, durante 15 minutos; d- por fim, foi pipetado 50 mL da solução para bloqueio da reação e procedida a leitura em um leitor de ELISA

(Biochrom Asys Expert Plus<sup>®</sup>, Cambridge, UK) com as absorvâncias de 450 nm (filtro de referência 630 nm ou 650 nm) dentro de 1 hora.

A partir da glicemia basal e da concentração sérica de insulina foram calculados os quatro índices de sensibilidade à insulina, com as seguintes equações (PÖPPL *et al.*, 2009):

Índice insulinogênico (II)= insulinemia ( $\mu$ U/mL) / glicemia (mg/dL);

Relação insulina:glicose corrigida (RI:GC)= insulinemia ( $\mu$ U/mL) x 100 / glicemia (mg/dL) - 30;

Modelo de avaliação da homeostase das células beta pancreáticas (HOMA B) = 20 x insulinemia ( $\mu$ U/mL) / glicemia (mmol/L) - 3,5;

Modelo de avaliação da homeostase sensibilidade da insulina as células beta (HOMA R)= insulinemia ( $\mu$ U/mL) x glicemia (mmol/L) / 22,5.

Conforme Pöpl *et al.* (2009) os valores de referência para o II aumentado > 0,235; RI:GC aumentado > 30; HOMA B 100%; HOMA R acima de 2,4 conforme Amaral *et al.* (2017).

#### 4.2.5 Avaliação de parâmetros renais

Amostras de soro congeladas à -70°C foram encaminhadas em compartimento refrigerado com gelo seco para o Laboratório IDDEX *Reference Laboratories*, em São Paulo, SP, Brasil, utilizando transporte aéreo. A mensuração da concentração da SDMA foi realizada por espectrocromatografia líquida de massa, de acordo com o padronizado pelo laboratório, foi considerado limite de normalidade valores abaixo de 14  $\mu$ g/dL, conforme descrito por Hall *et al.* (2014).

Foram realizadas também avaliações de albuminúria, em triplicata, com o teste ELISA *Dog Albumin Kit*<sup>®</sup>, com a técnica e a diluição das amostras realizadas de acordo com a recomendação do fabricante (Mybiosource, San Diego, EUA), com leitura no aparelho ELISA (Biochrom Asys Expert Plus<sup>®</sup>, Cambridge, UK). Segundo Herring *et al.* (2014) a microalbuminúria é definida quando as concentrações de albumina estão  $\geq$  2,5 mg/dL.

#### 4.2.6 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram registrados em planilha eletrônica (Microsoft Excel®), conferidos e exportados para posterior análise estatística utilizando o *software* Statistica – Statsoft® e *software* estatístico GraphPad Prism, versão 3.00 para Windows, San Diego – Califórnia, EUA. Os gráficos foram realizados através do *software* Minitab Express, versão 1.5.1 para Mac, Pensilvânia, EUA.

A análise estatística foi realizada de forma descritiva e todas as variáveis foram avaliadas quanto a distribuição de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, quando apropriado, o Teste *t* pareado foi utilizado. Quando as variáveis não estavam normalmente distribuídas, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). A correlação foi analisada de forma paramétrica e não paramétrica utilizando a correlação de Pearson e Spearman de acordo com as variáveis analisadas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PRIMEIRA ABORDAGEM

Os animais do grupo obesos apresentaram idade média de 4,9 anos, que variou de 1 a 8 anos. Dos 9 animais incluídos neste grupo, 77,7% (n=7) não tinham raça definida e 22,2% (n=2) eram da raça Labrador (TABELA 1). No grupo controle, os animais apresentaram idade média de 1,9 anos, que variou de 7 meses a 6 anos; 62,5% não tinham raça definida e havia um cão para cada uma das seguintes raças: São Bernardo, Lhasa-apso e Yorkshire.

**TABELA 1** – Dados referentes a idade, definição racial e peso dos animais obesos pertencentes ao estudo.

Grupo	N.	Idade (meses)	Definição racial	Peso (kg)
Obesos	1	24	SRD	19,5
	2	96	SRD	10,7
	3	48	SRD	7,9
	4	84	SRD	7,4
	5	48	SRD	17,0
	6	12	SRD	16,4
	7	96	Labrador	42,0
	8	36	Labrador	34,0
	9	84	SRD	23,4

Nota: N. = número; SRD = sem raça definida.

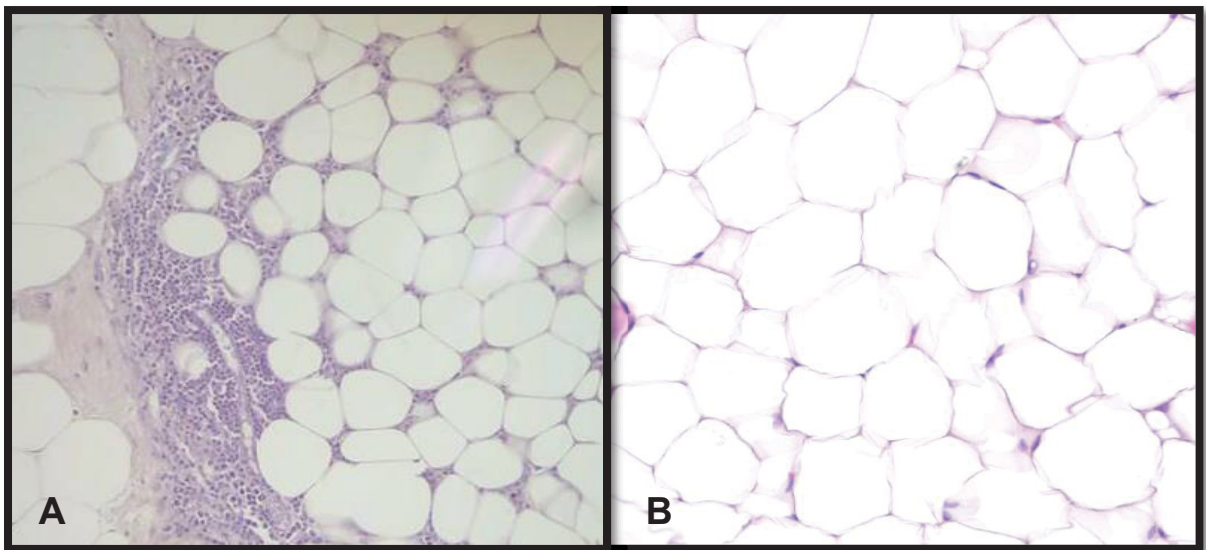
#### 5.1.1 Tamanho do adipócito

Os adipócitos subcutâneos e viscerais foram significativamente maiores em animais obesos em comparação com o tamanho de adipócitos observados em animais do grupo controle (TABELA 2).

### 5.1.2 Infiltrado leucocitário

A presença de leucócitos foi observada apenas nos tecidos subcutâneo e visceral de animais obesos (FIGURA 8), portanto houve diferença significativa entre os grupos ( $p=0,03$ ). No total de animais avaliados, 44,4% ( $n=5$ ) apresentaram infiltrado leucocitário no tecido subcutâneo ou visceral e destes 22,2% ( $n=2$ ) apresentaram em ambos os tecidos.

**FIGURA 8** – Imagens de histopatologia, coradas em Hematoxilina-Eosina (HE) com amplificação de 10x. **a)** Infiltrado leucocitário no tecido adiposo visceral de um animal obeso. **b)** Tecido adiposovisceral sem infiltrado leucocitário em um animal pertencente ao grupo controle.



### 5.1.3 Número de adipócitos

Os animais do grupo controle apresentaram maior contagem de adipócitos do que animais obesos, tanto no tecido visceral como subcutâneo. No entanto, a diferença significativa só foi detectada no tecido visceral do grupo controle (TABELA 2).

### 5.1.4 Imunoexpressão de TNF- $\alpha$

A imunoexpressão de TNF- $\alpha$  foi detectada em ambos os tecidos de todos os indivíduos no estudo. A expressão média de TNF- $\alpha$  observada no tecido visceral de animais obesos foi maior, no entanto, não foi detectada diferença significativa entre o grupo controle e os animais obesos (TABELA 2).

#### 5.1.4.1 Correlações

A imunexpressão do TNF- $\alpha$  não foi correlacionada com o tamanho do adipócito do tecido visceral considerando todos os animais que participaram do estudo. No entanto, em animais obesos, observou-se uma correlação positiva e significativa, coeficiente ( $\rho$ )= 0,9 ( $p=0,0009$ ), entre o tamanho de adipócitos e a imunexpressão de TNF- $\alpha$ . Considerando o tamanho do adipócito subcutâneo, não houve correlação com imunexpressão de TNF- $\alpha$  neste tecido, seja por grupo ou incluindo todos os indivíduos.

O infiltrado leucocitário foi correlacionado positivamente com a imunexpressão de TNF- $\alpha$  no tecido subcutâneo e visceral considerando o grupo obesos, no entanto, não foi observada significância.

A imunexpressão de TNF- $\alpha$  no tecido subcutâneo apresentou correlação significativa positiva com o número de adipócitos considerando todos os animais, em que o coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) de 0,74 ( $p=0,03$ ) foi observado.

**TABELA 2** –Tamanho do adipócito, número de adipócitos e imunexpressão do fator alfa de necrose tumoral no tecido adiposo com valores de média, desvio padrão e intervalo de confiança.

Variável	Controle Média (Desvio Padrão) (n=8)	Obesos Média (Desvio Padrão) (n=9)	Valor de p
Tamanho do adipócito( $\mu\text{m}^2$ )			
Subcutâneo	4779,5 ( $\pm$ 181,3)	7005,7 ( $\pm$ 434,7)	0,001*
Visceral	4730,7 ( $\pm$ 261,1)	7448,4 ( $\pm$ 613,8)	0,001*
Número de adipócitos			
Subcutâneo	380,4 ( $\pm$ 55,4)	304,2 ( $\pm$ 56,7)	0,1
Visceral	551,2 ( $\pm$ 87,5)	282,9 ( $\pm$ 39,0)	0,009*
Imunexpressão TNF- $\alpha$ (%)			
Subcutâneo	77,4 ( $\pm$ 5,4)	67,7 ( $\pm$ 3,9)	0,1
Visceral	70,7 ( $\pm$ 6,6)	72,0 ( $\pm$ 5,1)	1,0

Nota: n = número; TNF- $\alpha$  = fator alfa de necrose tumoral; \* = teste de Mann-Whitney.



## 5.2 SEGUNDA ABORDAGEM

Das 10 cadelas incluídas no estudo, todas eram castradas, 50% (n=5) eram sem raça definida (SRD) e as mesmas apresentaram peso variando de 3,8 a 15,0 kg, com média de peso de 12,4 kg (tempo 0) e peso variando de 3,3 a 14,4 kg, com média de peso de 11,8 kg (tempo 1) (TABELA 3), com média de emagrecimento por semana igual a 0,65%. Os animais apresentaram idade média de 70,8 meses, variando entre 36 a 120 meses.

**TABELA 3** – Dados referentes a idade, definição racial, peso dos animais incluídos no estudo.

N.	Idade (meses)	Definição racial	Peso (kg) (tempo 0)	Peso (kg) (tempo 1)
1	108	SRD	12,6	12,4
2	60	Fox terrier	11,5	10,7
3	36	SRD	13,1	12,7
4	36	SRD	14,4	14,0
5	84	Poodle	15,0	14,4
6	72	Beagle	14,8	14,3
7	36	Beagle	12,7	12,2
8	96	SRD	12,2	11,2
9	120	SRD	13,5	12,8
10	60	Pappilon	3,8	3,3

Nota: N. = número; kg = quilograma; SRD = sem raça definida.

Os valores individuais de ECC, IMCC, %GC, pressão arterial sistólica e medida da camada adiposa do tecido subcutâneo na sétima vertebra lombar (L7) estão descritos na TABELA 4.

**TABELA 4** – Valores individuais de escore de condição corporal (ECC), índice de massa corporal canina (IMCC), porcentagem de gordura corporal (%GC), pressão arterial sistólica e medida da camada adiposa de L7.

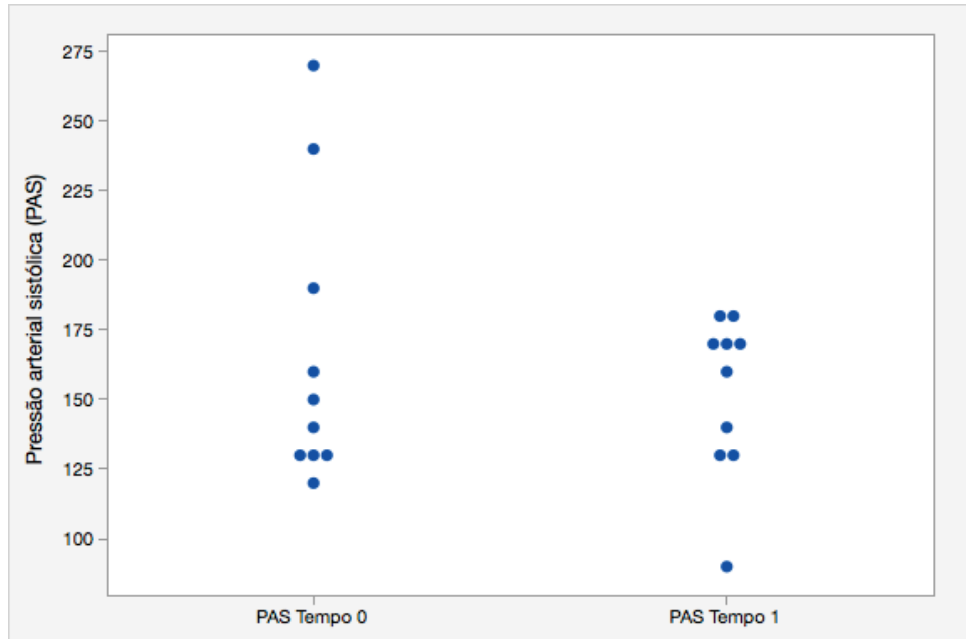
N.	ECC Tempo 0 e 1	IMCC Tempo 0 e 1	%GC Tempo 0 e 1	PAS (mmHg) Tempo 0 e 1	US (L7) Tempo 0 e 1
1	8 e 7	13,90 e 14,40	18,90 e 18,70	160 e 130	0,65 e 0,61
2	8 e 7	15,20 e 14,10	27,40 e 23,60	130 e 130	0,83 e 0,71
3	8 e 7	17,20 e 16,70	28,30 e 25,50	130 e 170	0,90 e 0,87
4	8 e 7	17,50 e 17,80	29,40 e 29,40	130 e 90	1,24 e 1,08
5	9 e 8	20,80 e 19,90	30,50 e 31,40	140 e 140	1,93 e 1,34
6	9 e 8	17,10 e 16,50	36,80 e 28,10	240 e 160	1,91 e 1,68
7	8 e 7	15,00 e 14,40	40,40 e 34,80	150 e 170	1,95 e 1,89
8	8 e 7	16,10 e 14,10	32,80 e 27,20	190 e 180	1,31 e 1,08
9	9 e 8	16,30 e 14,10	42,30 e 41,30	270 e 180	2,90 e 2,23
10	8 e 7	10,90 e 5,90	21,20 e 19,00	120 e 170	1,07 e 0,92

Nota: N. = número; ECC = escala de escore corporal; IMCC = índice de massa corporal canina; %GC = porcentagem de gordura corporal; PAS = média da pressão arterial sistólica; US (L7) = medida da camada adiposa do tecido subcutâneo na sétima vertebra lombar.

Considerando os valores de IMCC, 70% (n=7) dos pacientes apresentaram valores acima da normalidade e 80% (n=8) reduziram após o PPP. Quanto aos valores de %GC, 90% (n=9) foram classificadas como obesas e 80% (n=8) reduziram os valores após o emagrecimento.

A média da pressão arterial sistólica (PAS) maior ou igual a 150 mmHg foi observada em 50% (n=5) dos pacientes no tempo 0, com redução após o emagrecimento em 40% (n=4). Já no tempo 1, 30% (n=3) dos pacientes apresentaram aumento da PAS quando comparado ao tempo 0. No GRÁFICO 1 estão representados os valores individuais da PAS nos diferentes momentos de avaliação (tempo 0 e tempo1).

**GRÁFICO 1** – Valores individuais da pressão arterial sistólica (PAS) dos animais incluídos no estudo, nos tempos 0 e 1.



Na TABELA 5 estão dispostos os valores da mediana, valor mínimo e valor máximo da ECC, além do valor de  $p$  dos animais em diferentes tempos. Já na TABELA 6 encontram-se dispostas as variáveis IMCC, %GC, PAS, US (L7) com valores da média, desvio padrão e valor de  $p$  dos animais no tempo 0 e no tempo 1, incluídos no estudo. Na comparação dos tempos 0 e 1, houve diferença significativa entre os grupos na comparação de ECC ( $p=0,002$ ), IMCC ( $p=0,038$ ), %GC ( $p=0,014$ ) e USL7 ( $p=0,010$ ). Quanto a variável PAS não foi observado diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os valores da média dos tempos 0 e 1.

**TABELA 5** – Escore de condição (ECC) com os valores da mediana, valor mínimo, valor máximo e valor de  $p$  dos animais incluídos no estudo.

Variável	Tempo 0 Mediana (Valor máximo e mínimo) (n=10)	Tempo 1 Mediana (Valor máximo e mínimo) (n=10)	Valor de $P$
ECC	8,3 (8 e 9)	7,3 (7 e 8)	0,002*

Nota: n = número; ECC = escala de escore corporal; \* = teste de Wilcoxon.

**TABELA 6** – Índice de massa corporal (IMCC), porcentagem de gordura corporal (%GC), pressão arterial sistólica (PAS), medida da camada adiposa do tecido subcutâneo na sétima vertebra lombar

(US L7) representados pelos valores da média, desvio padrão e valor de p das variáveis dos animais incluídos no estudo.

<b>Variável</b>	<b>Tempo 0 Média (Desvio Padrão) (n=10)</b>	<b>Tempo 1 Média (Desvio Padrão) (n=10)</b>	<b>Valor de p</b>
IMCC	16,00 (±2,58)	14,79 (±3,68)	0,038*
%GC	30,80 (±7,58)	27,90 (±6,91)	0,014*
PAS	166,00 (±51,47)	152 (±28,93)	0,36
US (L7)	1,49 (±0,69)	1,24 (±0,53)	0,010*

Nota: n = número; IMCC = índice de massa corporal canina; %GC = porcentagem de gordura corporal; PAS = média da pressão arterial sistólica; US (L7) = medida da camada adiposa do tecido subcutâneo na sétima vertebra lombar; \* = teste t para amostras pareadas.

### 5.2.1 Avaliação do Eixo hipotálamo, hipófise, adrenal

A TABELA 7 apresenta valores individuais de cortisol plasmático basal e após duas horas da administração intramuscular de 5 µg/kg de ACTH sintético no tempo 0 e tempo 1.

**TABELA 7** – Valores individuais de cortisol basal e após teste de estimulação com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) dos animais incluídos no estudo.

<b>N.</b>	<b>Cortisol basal (µg/dL) Tempo 0</b>	<b>Cortisol após EACTH (µg/dL) Tempo 0</b>	<b>Cortisol basal (µg/dL) Tempo 1</b>	<b>Cortisol após EACTH (µg/dL) Tempo 1</b>
1	10,72	13,84	4,83	7,43
2	2,24	8,15	0,85	5,09
3	7,61	15,36	11,54	19,03
4	10,54	10,69	1,52	16,08
5	5,72	10,87	5,99	8,29
6	4,69	6,31	6,42	9,57
7	2,49	9,02	3,89	10,26
8	5,86	18,75	10,37	19,33
9	5,11	7,78	6,49	14,85
10	1,62	15,94	7,39	14,02

Nota: N. = número; EACTH = Estimulação com hormônio adrenocorticotrófico sintético; ACTH = hormônio adrenocorticotrófico.

Valores de referência: Cortisol basal 1 a 4 µg/dL; Cortisol após EACTH 5 a 17 µg/dL.

Considerando o valor de cortisol basal no tempo 0, 70% (n=7) dos animais apresentaram valor acima da referência e após o PPP, enquanto no tempo 1, 60% (n=6) dos animais tiveram aumento do cortisol basal. Quanto ao cortisol após estimulação com ACTH no tempo 0, 10% (n=1) apresentaram valores acima da referência, enquanto após o PPP, 20% (n=2) apresentaram aumento do cortisol após o estímulo com ACTH exógeno.

Na TABELA 8 encontram-se dispostos os valores da média, desvio padrão e valor de p dos animais no tempo 0 e no tempo 1, incluídos no estudo. Na comparação dos tempos 0 e 1 não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos cortisol basal (tempo 0) com cortisol basal (tempo 1), da mesma forma que na comparação cortisol após estimulação com ACTH (tempo 0) com cortisol após estimulação com ACTH (tempo 1).

**TABELA 8** – Valores do cortisol basal e do cortisol após o teste de estimulação com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) representados pela média, desvio padrão e valor de p.

<b>Variável</b>	<b>Tempo 0 Média (Desvio Padrão) (n=10)</b>	<b>Tempo 1 Média (Desvio Padrão) (n=10)</b>	<b>Valor de p</b>
Cortisol basal	5,660 ( $\pm 3,207$ )	5,929 ( $\pm 3,408$ )	0,858
Cortisol após EACTH	11,671 ( $\pm 4,104$ )	12,895 ( $\pm 5,903$ )	0,411

Nota: n = número; EACTH = estimulação com hormônio adrenocorticotrófico sintético.

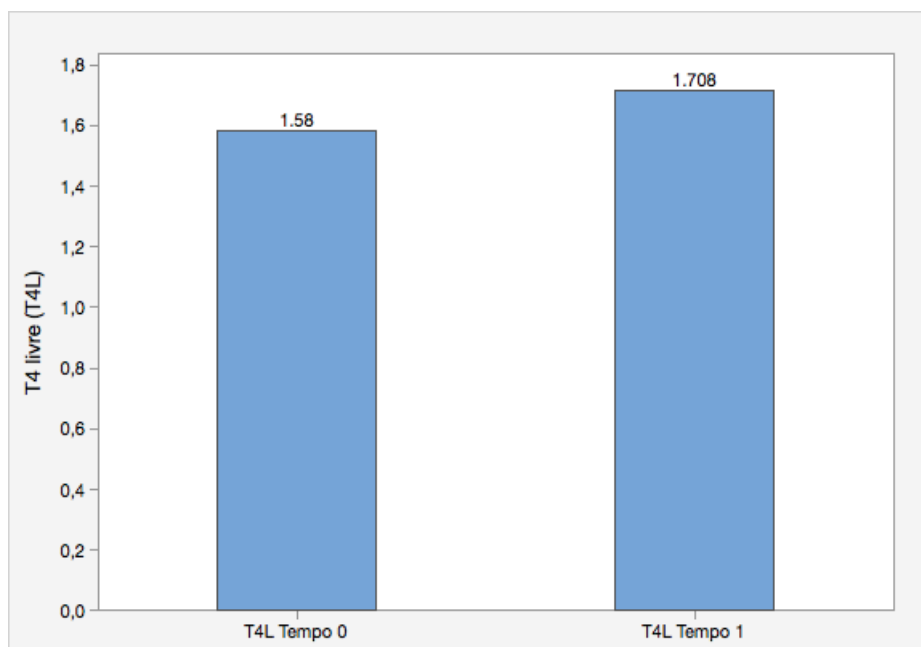
### 5.2.2 Avaliação do hormônio tireoidiano

Os valores individuais da T4L por diálise de equilíbrio estão dispostos na TABELA 9. Quanto à análise estatística na comparação dos tempos 0 e 1, não houve diferença significativa entre os grupos ( $p=0,251$ ). Considerando os valores individuais de T4L no tempo 0 e 1 todos os animais apresentaram valores dentro da referência, conforme o GRÁFICO 2.

**TABELA 9** – Valores individuais da tiroxina livre (T4L) dos animais incluídos no estudo.

N.	T4L (ng/dL) Tempo 0	T4L (ng/dL) Tempo 1
1	1,6	2,0
2	1,4	1,8
3	2,1	2,1
4	1,1	1,2
5	1,0	1,4
6	1,7	1,9
7	2,1	1,4
8	1,0	2,0
9	1,1	1,3
10	1,7	2,0

Nota: N. = número; T4L = tiroxina livre por diálise de equilíbrio.  
Valores de referência: 0,6 a 3,7 ng/dL.

**GRÁFICO 2** – Médias dos valores de tiroxina livre (T4L) no tempo 0 e tempo 1.

### 5.2.3 Avaliação da peroxidação lipídica e insulina

Valores individuais do TBARS, insulina, índice insulinogênico, relação insulina:glicose corrigida (RI:GC), HOMA B e HOMA R, distribuídos em tempo 0 e tempo 1, estão descritos nas TABELAS 10 e 11.

**TABELA 10** – Valores individuais do teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), insulina, índice insulinogênico (II) dos animais incluídos no estudo.

N.	TBARS ( $\mu\text{M}$ ) Tempo 0	TBARS ( $\mu\text{M}$ ) Tempo 1	Insulina ( $\text{pmol/L}$ ) Tempo 0	Insulina ( $\text{pmol/L}$ ) Tempo 1	II Tempo 0	II Tempo1
1	83,670	76,520	23,472	84,177	0,033	0,162
2	100,330	82,240	177,576	149,034	0,291	0,236
3	185,570	138,900	17,189	22,833	0,019	0,043
4	96,050	73,190	36,039	28,904	0,056	0,066
5	97,950	85,10	47,115	142,325	0,076	0,273
6	108,900	65,100	112,931	45,624	0,201	0,059
7	72,710	62,710	51,268	44,133	0,095	0,069
8	185,100	91,290	47,434	47,860	0,086	0,068
9	117,480	105,260	162,772	113,038	0,266	0,189
10	115,710	106,150	37,317	56,700	0,072	0,105

Nota: N. = número; TBARS = teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (valor de referência: 0 a  $50\mu\text{M}$ ); insulina (valor de referência: 66 a  $90\text{ pmol/L}$ ) II = índice insulinogênico (valor de referência: aumentado  $>0,235$ ).



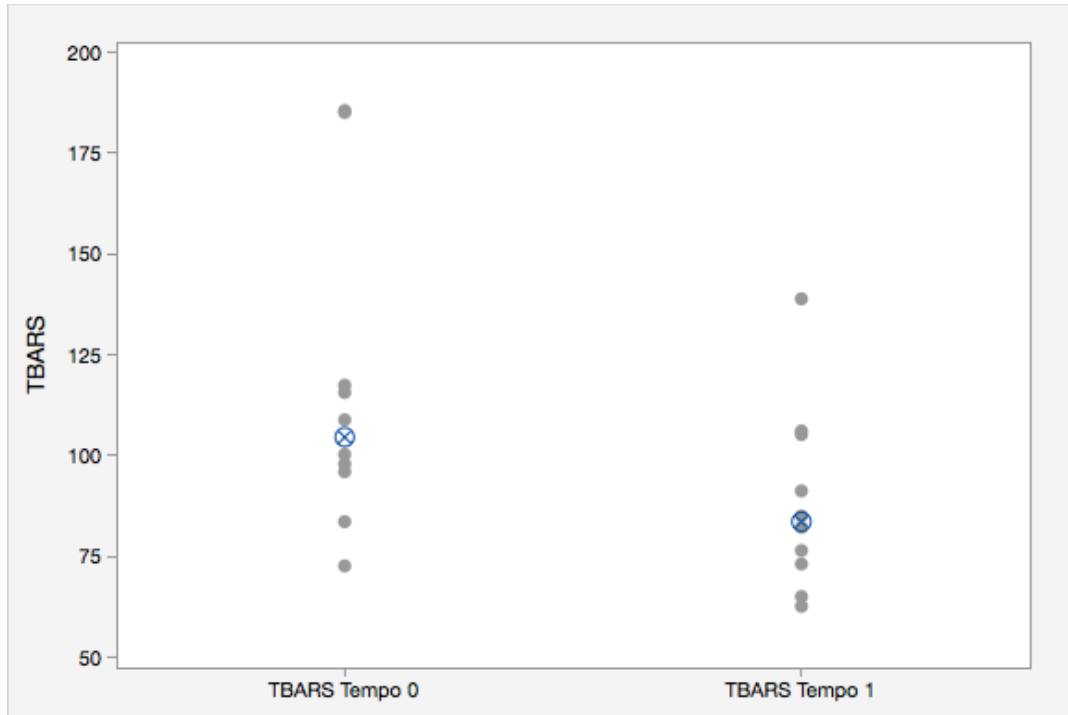
**TABELA 11** – Valores individuais da relação insulina:glicose corrigida (RI:GC); percentual de atividade das células beta (HOMA B) e sensibilidade da insulina as células beta (HOMA R) dos animais incluídos no estudo.

N.	RI:GC Tempo 0	RI:GC Tempo 1	HOMA B Tempo 0	HOMA B Tempo 1	HOMA R Tempo 0	HOMA R Tempo1
1	4,630	26,937	40,334	365,932	0,770	2,240
2	44,088	35,182	369,522	276,826	5,551	4,817
3	2,552	7,148	13,953	91,588	0,775	0,616
4	8,237	12,613	62,488	16648,80	1,190	0,648
5	11,499	45,544	94,296	618,711	1,489	3,792
6	31,886	8,111	326,876	49,388	3,249	1,799
7	15,380	10,250	178,109	79,143	1,420	1,442
8	13,940	9,707	154,536	65,465	1,331	1,717
9	40,412	29,067	338,717	255,734	5,088	3,453
10	11,941	17,010	162,344	196,979	0,990	1,571

Nota: N. = número; RI:GC = relação insulina:glicose corrigida (valor de referência: aumentado >30); HOMA B = percentual de atividade das células beta (valor de referência: 100%); HOMA R = sensibilidade da insulina as células beta (valor de referência: acima de 2,4), conforme Amaral *et al.* (2017).

Considerando os valores individuais de TBARS todos os animais no tempo 0 apresentaram valores acima do valor de referência e, todos os animais reduziram os valores de TBARS após o PPP (tempo 1), conforme demonstrado no GRÁFICO 3.

**GRÁFICO 3** – Representação gráfica dos valores individuais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) dos animais no tempo 0 e tempo 1. Valores da mediana marcados em azul.



Considerando os valores individuais de insulina no tempo 0 foi observado hipoinsulinemia em 70% (n=7) dos pacientes, e hiperinsulinemia em 30 (n=3). Quando avaliado os valores individuais no tempo 1 60% (n=6) apresentaram hipoinsulinemia, enquanto 30% (n=3) hiperinsulinemia e 10% (n=1) normoinsulinemia. Quando analisado os valores de II nos tempos 0 e 1 foi observado aumento em 20% (n=2), já nos valores de RI:GC foi constatado um aumento na relação em 30% (n=3) dos animais no tempo 0 e 20% (n=2) no tempo 1.

Quanto aos valores de HOMA B foi constatado aumento da atividade em 60% (n=6) dos pacientes em ambos os tempos, a diminuição da atividade foi constatada em 30% (n=3) dos pacientes. Levando em conta os valores individuais de HOMA R foi observado alteração em 30% (n=3) no tempo 0 e no tempo 1.

Na TABELA 12 estão dispostos os valores da mediana, valor mínimo e valor máximo do TBARS, insulina, II, RI:GC, HOMA B, HOMA R, além do valor de p dos animais em diferentes tempos. Nota-se uma diferença significativa entre os tempos quando comparado os valores da mediana do TBARS.

**TABELA 12** – Teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), insulina, índice insulinogênico (II), relação insulina:glicose corrigida (RI:GC), percentual de atividade das células beta (HOMA B), sensibilidade da insulina as células beta (HOMA R) dos animais incluídos no estudo representados pelos valores da mediana, valor mínimo, valor máximo e valor de p.

<b>Variável</b>	<b>Tempo 0 Mediana (valor mínimo e máximo) (n=10)</b>	<b>Tempo 1 Mediana (valor mínimo e máximo) (n=10)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>TBARS</b>	99,104 (72,710-185,570)	83,670 (62,710-138,900)	0,005*
<b>Insulina</b>	37,317 (17,189-177,576)	56,699 (22,833-149,034)	0,612
<b>II</b>	0,070 (0,019-0,291)	0,104 (0,043-0,273)	0,959
<b>RI:GC</b>	11,499 (2,552-44,088)	17,010 (7,148-45,544)	0,958
<b>HOMA R</b>	1,190 (0,775-5,551)	1,570 (0,616-4,817)	0,959
<b>HOMA B</b>	94,296 (13,953-369,522)	276,825 (79,143-16648,800)	0,799

Nota: n = número; TBARS = teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico; II = índice insulinogênico; RI:GC = relação insulina:glicose corrigida; HOMA R = sensibilidade da insulina as células beta; HOMA B = percentual de atividade das células beta; \* = Teste de Wilcoxon.

#### 5.2.4 Avaliação dos parâmetros renais

Valores individuais da SDMA sérica e albuminúria, distribuídos em tempo 0 e tempo 1, estão descritos na TABELA 13.

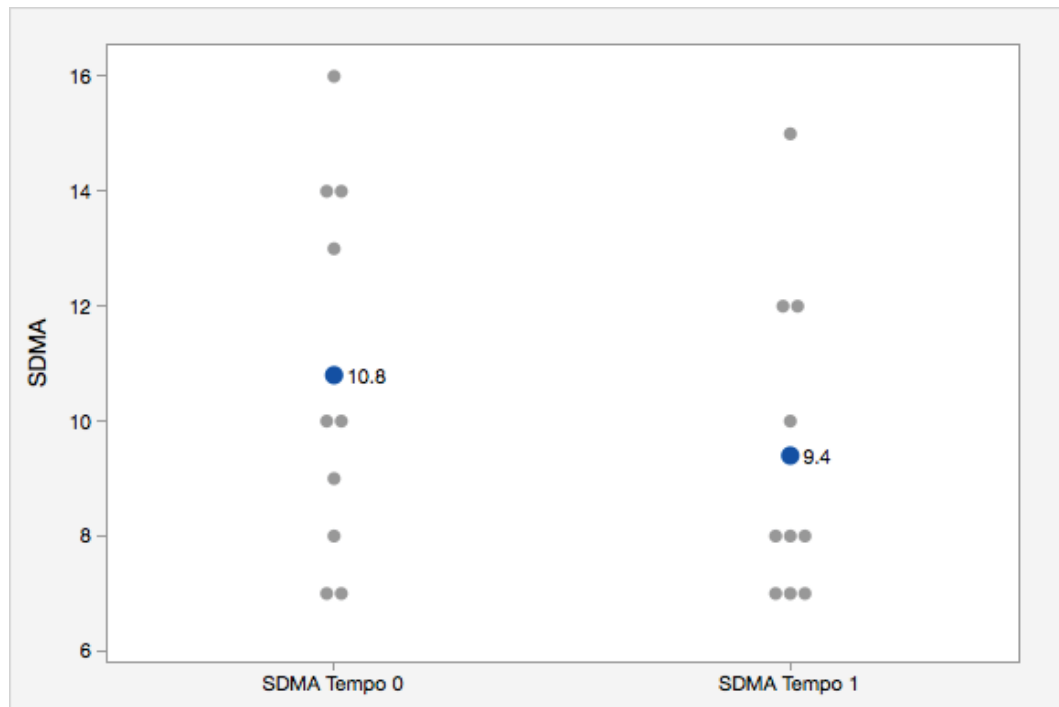
**TABELA 13** – Valores individuais da dimetilarginina simétrica sérica (SDMA) e albuminúria, dos pacientes incluídos no estudo.

N.	SDMA ( $\mu\text{g/dL}$ ) Tempo 0	SDMA ( $\mu\text{g/dL}$ ) Tempo 1	Albuminúria ( $\text{mg/dL}$ ) Tempo 0	Albuminúria ( $\text{mg/dL}$ ) Tempo 1
1	14,00	12,00	1,20	2,47
2	7,00	7,00	1,62	2,44
3	10,00	8,00	2,34	2,41
4	7,00	7,00	0,30	0,40
5	9,00	8,00	3,61	2,46
6	14,00	12,00	A	A
7	16,00	15,00	19,86	2,74
8	13,00	10,00	A	A
9	10,00	8,00	A	A
10	8,00	7,00	6,45	8,07

Nota: N. = número; SDMA = dimetilarginina simétrica (valor de referência  $\leq 14\mu\text{g/dL}$ ); A = ausente; albuminúria (valor de referência: microalbuminúria  $\geq 2,5\text{ mg/dL}$ ).

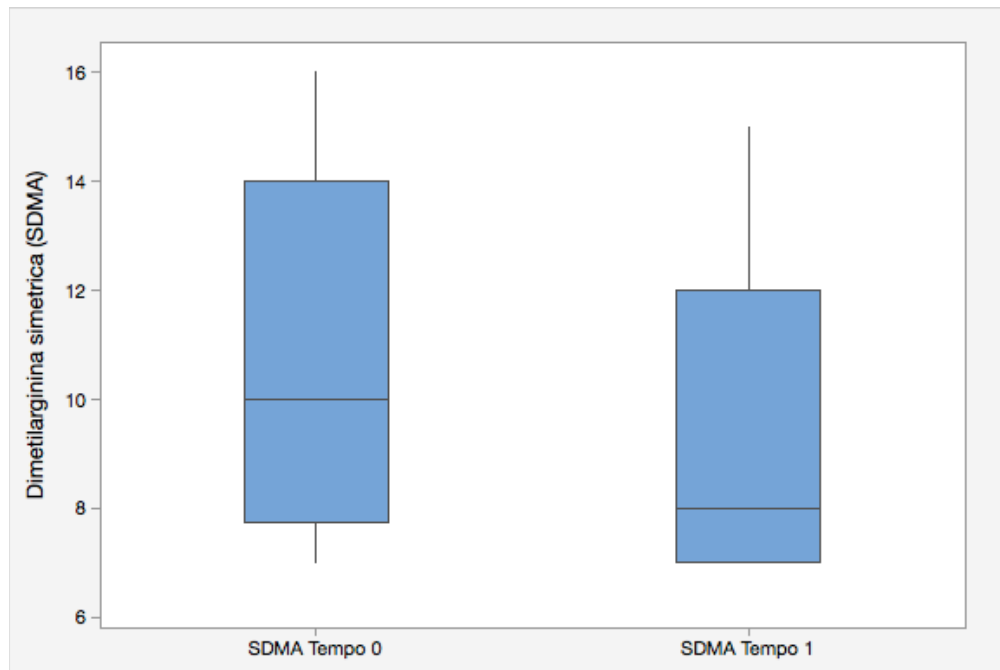
Das 10 cadelas avaliadas no tempo 0, 10% (n=1) apresentaram valores de SDMA acima dos valores de referência e, 20% (n=2) apresentaram valores limítrofes ( $14\mu\text{g/dL}$ ). Dos animais avaliados, 80% (n=8) reduziram os valores de SDMA após o PPP (tempo 1). No GRÁFICO 4 estão representados os valores individuais da SDMA.

**GRÁFICO 4** – Representação gráfica dos valores individuais da dimetilarginina simétrica (SDMA) dos animais no tempo 0 e tempo 1. Valores médios marcados com cor azul.



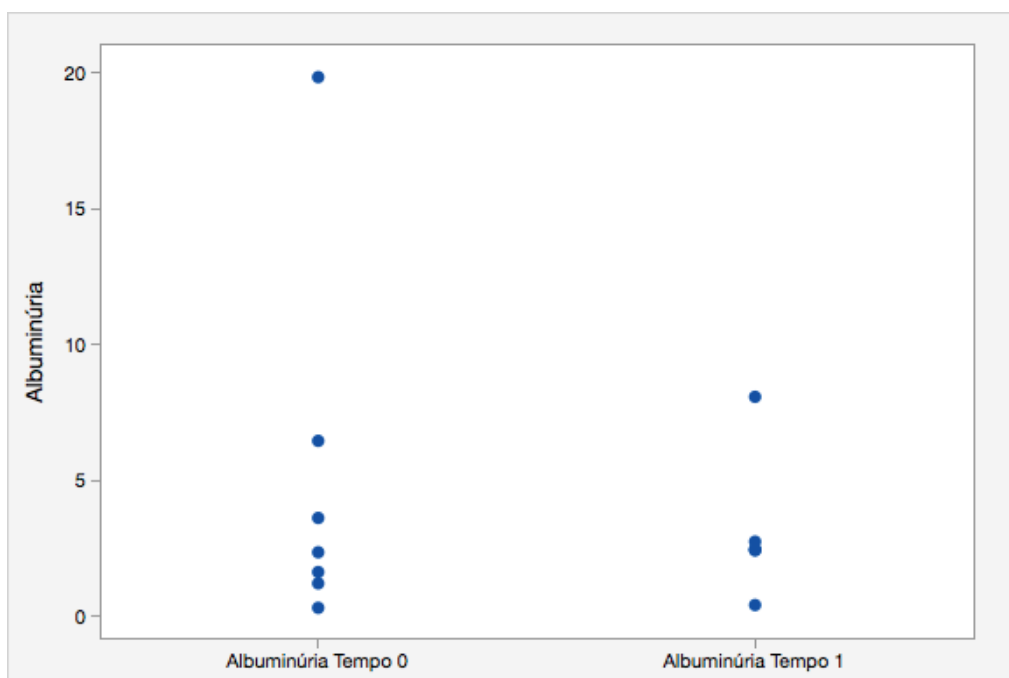
No GRÁFICO 5 estão dispostos os valores das médias, dos percentuais de 25 e 75% e os valores máximos e mínimos da variável SDMA dos cães incluídos no estudo. Na análise estatística da variável SDMA foi observada diferença significativa na comparação dos tempos 0 e 1 ( $p=0,0013$ ), com valores médios de 10,8 no tempo 0 e 9,4 no tempo 1.

**GRÁFICO 5** – Representação dos valores da mediana, percentuais de 25% e 75% e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da dimetilarginina simétrica (SDMA) das cadelas pertencentes ao estudo, tempo 0 e 1 (SDMA  $p=0,001$  \* Teste t amostras pareadas).



A microalbuminúria foi detectada em 3 pacientes, de 7 (42,8%) que realizaram o exame, e a mesma se manteve em 2 pacientes após o programa de perda de peso conforme ilustrado no GRÁFICO 6. No entanto, não foi observado diferença ( $p>0,05$ ) entre os tempos 0 e 1.

**GRÁFICO 6** – Valores individuais da albuminúria dos animais incluídos no estudo, nos tempos 0 e 1.



### 5.2.5 Análise de Correlações

Frente à diferença significativa entre ECC, IMCC, %GC, US (L7), SDMA e TBARS, quando comparado os tempos 0 e 1, foram determinadas as correlações de Pearson e Spearman de acordo com a variável analisada, conforme descrito nas TABELAS 14 e 15.

A correlação entre peso e IMCC, assim como ECC e US (L7) apresentaram correlação positiva em ambos os tempos avaliados com representação significativa nos valores de p, conforme as TABELAS 14 e 15.

A correlação entre a variável TBARS e marcadores de resistência insulínica (II, RI:GC, HOMA), utilizando o coeficiente de Spearman não apresentaram significância. Assim como a correlação entre a variável TBARS e a SDMA; TBARS e peso; TBARS e ECC; TBARS e IMCC; TBARS e %GC; albuminúria e SDMA; albuminúria e colesterol, avaliadas no tempo 0 e tempo 1. A correlação entre a variável SDMA e peso; SDMA e ECC; SDMA e IMCC; SDMA e %GC; SDMA e creatinina; SDMA e PAS utilizando o coeficiente de Pearson não apresentaram significância.

**TABELA 14** – Escore de condição corporal (ECC), índice de massa corporal canina (IMCC), porcentagem de gordura corporal (%GC) e medida da camada adiposa do tecido subcutâneo na sétima vertebra lombar (US L7) representados pelos coeficientes de correlação, valor de p dos animais incluídos no estudo no tempo 0.

Variável	Peso Tempo 0	ECC Tempo 0	IMCC Tempo 0	%GC Tempo 0
ECC Tempo 0	p= 0,018 (ρ)= 0,720	-----	-----	-----
IMCC Tempo 0	p= 0,002 (r)= 0,840	p= 0,146 (ρ)= 0,490	-----	-----
%GC Tempo 0	p= 0,146 (r)= 0,490	p= 0,080 (ρ)= 0,560	p= 0,250 (r)= 0,400	-----
US (L7) Tempo 0	p= 0,310 (r)= 0,350	p= 0,040 (ρ)= 0,640	p= 0,301 (r)= 0,360	p= 0,001 (r)= 0,860

Nota: ECC = escore de condição corporal; IMCC = índice de massa corporal canina; %GC = porcentagem de gordura corporal; US (L7) = medida da camada adiposa do tecido subcutâneo na sétima vertebra lombar; (ρ) = coeficiente de Spearman; (r) = coeficiente de Pearson; p = significância.



**TABELA 15** – Escore de condição corporal (ECC), índice de massa corporal canina (IMCC), porcentagem de gordura corporal (%GC) e medida da camada adiposa do tecido subcutâneo na sétima vertebra lombar (US L7) representados pelos coeficientes de correlação, valor de p dos animais incluídos no estudo no tempo 1.

<b>Variável</b>	<b>Peso Tempo 1</b>	<b>ECC Tempo 1</b>	<b>IMCC Tempo 1</b>	<b>%GC Tempo 1</b>
ECC Tempo 1	p= 0,085 ( $\rho$ ) = 0,560	-----	-----	-----
IMCC Tempo 1	p<0,0001 (r) = 0,940	p= 0,450 ( $\rho$ ) = 0,270	-----	-----
%GC Tempo 1	p= 0,135 (r) = 0,500	p= 0,08 ( $\rho$ ) = 0,560	p= 0,249 (r) = 0,400	-----
US (L7) Tempo 1	p= 0,382 (r) = 0,310	p= 0,04 ( $\rho$ ) = 0,640	p= 0,674 (r) = 0,152	p= 0,0004 (r) = 0,890

Nota: ECC = escore de condição corporal; IMCC = índice de massa corporal canina; %GC = porcentagem de gordura corporal; US (L7) = medida da camada adiposa do tecido subcutâneo na sétima vertebra lombar; ( $\rho$ ) = coeficiente de Spearman; (r) = coeficiente de Pearson; p = Significância.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 PRIMEIRA ABORDAGEM

No presente trabalho foi investigado o tecido adiposo subcutâneo e visceral de cadelas obesas e cadelas com condição corporal normal, quanto ao tamanho e número dos adipócitos, à presença de infiltrado leucocitário e a correlação com a imunoe expressão do TNF- $\alpha$ .

Conforme esperado, o tamanho dos adipócitos, nos tecidos das regiões subcutânea e visceral dos animais obesos foi notavelmente maior em comparação aos animais com condição corporal ideal. Nossos dados estão de acordo com os de Cao (2014) e Kabir *et al.* (2011) que observaram que a hipertrofia dos adipócitos representa a principal alteração morfológica no tecido adiposo de indivíduos obesos e, está diretamente relacionada com o estado inflamatório crônico da obesidade (Skurk *et al.*, 2007).

Contudo, quando comparado o tamanho dos adipócitos da região subcutânea e visceral dos obesos, não foram detectadas diferenças significativas. No estudo de Kabir *et al.* (2011), foi identificado que os adipócitos do tecido adiposo visceral de cães obesos eram maiores do que da região subcutânea. Consideramos que a falta de diferenças entre os tecidos poderia ter um componente temporal na cronicidade da obesidade nos cães investigados no presente estudo. Lee *et al.* (2012), demonstraram que o alargamento inicial dos adipócitos ocorre no tecido adiposo subcutâneo e progride para a região visceral com a evolução da obesidade, ocasionando, a longo prazo, um aumento do tamanho dos adipócitos em ambas as regiões.

Se por um lado há diferenças no tamanho dos adipócitos dos cães obesos, outro ponto relevante seria quanto as consequências do processo de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos em termos de número. Neste estudo, o número de adipócitos/mm<sup>2</sup> constatado foi maior no tecido adiposo visceral das cadelas com ECC normal. O evidente motivo para este achado é que a contagem do número de adipócitos foi realizada em uma área pré determinada em ambos os grupos e nas cadelas obesas foi identificado uma hipertrofia dos adipócitos. Entretanto, a estimativa de números absolutos revela um aumento da quantidade de adipócitos em obesos, assim como previamente constatado no trabalho de Kranendonk *et al.* (2015).

No presente estudo foi realizada a correlação entre o tamanho adipocitário e a sua capacidade de produzir TNF- $\alpha$  em ambos os tecidos. E dentre os resultados foi observado correlação positiva entre o tamanho dos adipócitos e a imunoexpressão de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo visceral das cadelas obesas, mas não no subcutâneo. Segundo Cao (2014) a hipertrofia dos adipócitos pode favorecer a desregulação na expressão e secreção das adipocinas. Estas citocinas podem estar relacionadas ao conceito de inflamação metabólica em humanos, animais de laboratório e cães obesos (GERMAN *et al.*, 2009; RYAN *et al.*, 2010) e, pode induzir a apoptose de pré-adipócitos e adipócitos maduros, favorecendo o alargamento das células remanescentes e conseqüentemente a secreção de mais adipocinas (GOOSSENS, 2008).

Alguns estudos sugerem que a expansão do tecido adiposo desencadeia quadro de hipóxia e apoptose celular, que são fatores de recrutamento dos macrófagos (GOOSSENS, 2008; CAO, 2014). Estes macrófagos adquirem o fenótipo M1 e secretam mais citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-6 e espécies reativas de oxigênio, que exacerbam o quadro inflamatório crônico associado à obesidade (LUMENG *et al.*, 2007; FINUCANE *et al.*, 2014).

No presente estudo, observou-se que apenas os animais obesos apresentaram infiltrado leucocitário no tecido adiposo, tanto no subcutâneo quanto visceral. Embora não tenha sido identificado o tipo celular específico nas amostras avaliadas, pode-se supor que o infiltrado leucocitário possa ter origem macrofágica, pela presença de células mononucleadas. Porém, são necessárias outras análises para a confirmação desta hipótese. Em pessoas obesas, a presença de grande número de macrófagos no tecido adiposo foi descrito por Hotamisligil *et al.* (1993). Atualmente, tem sido reconhecido que o aumento do TNF- $\alpha$  é devido à infiltração de macrófagos M1 no tecido adiposo, o que corrobora com os achados do presente estudo, onde observamos correlação positiva entre a imunoexpressão de TNF- $\alpha$  e o infiltrado leucocitário nas cadelas obesas. Rafaj *et al.* (2017) sugerem que a principal fonte de produção de citocinas na obesidade poderia estar associada a macrófagos infiltrados no tecido adiposo e, acumulados durante processos de hipoxia, desempenhando papel fundamental nos processos inflamatórios associados à obesidade.

## 6.2 SEGUNDA ABORDAGEM

No presente estudo foram avaliados parâmetros antes e após 8 semanas de PPP e, ao longo do estudo, a porcentagem de perda de peso corporal média por semana ficou abaixo de 1%, sendo o recomendável para cães entre 1 e 2% (LAFLAMME *et al.*, 1997). Um provável motivo para uma menor redução de peso do que o esperado é o fato do estudo envolver animais de diferentes proprietários, assim como já relatado em outros estudos que também resultaram em taxa semanal inferior a 1% (CARCIOFI *et al.*, 2005; GERMAN *et al.*, 2007).

Todos os animais incluídos no estudo apresentavam ECC que os levava à classificação como obesos, considerando os valores de IMCC, 70% (n=7) dos pacientes apresentaram valores acima da normalidade e 80% (n=8) reduziram após o PPP e quando comparados foi constatada diferença significativa entre os tempos, tanto para ECC quanto para o IMCC, confirmando informações descritas por Muller *et al.* (2008) que validaram o IMCC e afirmaram que o mesmo pode ser utilizado como um dado médio de cálculo para tratamentos e para orientar treinamentos físicos de caninos. Quando analisamos as correlações o IMCC assim como ECC, %GC e US (L7) apresentaram correlação positiva em ambos os tempos avaliados, com representação significativa entre eles, o que demonstra a possibilidade de utilização de medidas fáceis, de baixo custo e rápidas de serem utilizadas para o diagnóstico e monitoramento dos pacientes submetidos a PPP.

### 6.2.1 Eixo hipotálamo, hipófise, adrenal

As disfunções do eixo hipotálamo, hipófise adrenal na obesidade são amplamente estudadas em pessoas. Pasquali *et al.* (1993), em um dos primeiros trabalhos publicados neste assunto, demonstraram que mulheres com obesidade central apresentaram um aumento significativo de cortisol e ACTH após estímulo com CRH, em relação a controles não obesas, ou mulheres com obesidade periférica. No entanto, na medicina veterinária apenas alguns estudos foram descritos em cães (GAYET *et al.*, 2004; MARTIN *et al.*, 2006).

Lordelo *et al.* (2007) afirmam que apesar das sutis alterações encontradas, não há evidência de hipercortisolismo clínico em indivíduos obesos e, afirmam que os dois parâmetros principais utilizados para avaliar hipercortisolismo sistêmico são o cortisol urinário livre e o cortisol sérico matinal. O último é mais importante e preciso, conforme realizado no presente estudo.

Considerando o valor de cortisol basal matinal sanguíneo nas cadelas obesas foi verificado hipercortisolemia basal. Segundo Rodriguez *et al.* (2015) o aumento das concentrações de cortisol é causalmente ligado ao acúmulo de gordura e ganho de peso em pessoas, pois os glicocorticóides promovem a conversão de pré-adipócitos em adipócitos maduros. Entretanto, Martin *et al.* (2006) publicaram um dos únicos estudos com cães obesos, e verificaram uma normalidade nos valores de cortisol basal. Adicionalmente, Gayet *et al.* (2004) estudou as modificações do cortisol após o ganho de peso em nove cadelas castradas, da raça Beagle e, constatou que o cortisol plasmático basal permaneceu inalterado durante o período de aumento de peso.

Martin *et al.* (2006) observaram aumento do cortisol após o teste de estimulação com ACTH em 13% dos pacientes obesos, sendo estes achados similares aos observados nos nossos pacientes em que o cortisol após estimulação com ACTH no tempo 0, 10% (n=1) apresentou valor acima da referência, enquanto após o PPP, 20% (n=2) apresentaram aumento do cortisol após o estímulo com ACTH exógeno. No entanto, todos os animais incluídos no estudo estavam livres de sinais clínicos compatíveis com hiperadrenocorticismos.

É necessário levar em conta na avaliação do eixo o sexo dos animais inseridos no estudo. Segundo Pessina *et al.* (2009) existem diferenças de acordo com o sexo na resposta do cortisol à estimulação do ACTH e inibição da dexametasona em cães saudáveis, sendo essa resposta maior em cadelas do que em machos.

Soder *et al.* (2016) descreveram que embora tenha sido sugerido um papel do cortisol na obesidade humana, os resultados são inconclusivos. Tenk *et al.* (2016) realizaram uma meta-análise com 26 artigos e concluíram que a obesidade não leva à atividade aumentada do eixo HPA, os níveis de cortisol periférico diminuíram.

### 6.2.2 Hormônio tireoidiano

Os valores do T4L permaneceram dentro do intervalo de referência antes e após o emagrecimento, o que concorda com um estudo realizado em humanos por Dall'Asta *et al.* (2010) que observaram valores de TSH, T3 Livre e T4L normais em indivíduos obesos submetidos a emagrecimento. Daminet *et al.* em 2003 avaliaram em cães obesos o T4 total e T3, que apresentaram discreto aumento, mas não foi identificada alteração no hormônio estimulante da tireóide ou no T4L destes animais. Já Martin *et al.* (2006) concluíram que 42% dos cães (13 de 31 cães) sofriam de

hipotireoidismo e que a alteração da função tiroideia é um evento primário na obesidade e inclusive é sugerido pelos autores que os cães devem ser tratados para essa condição, além de receber uma dieta hipocalórica.

Ferguson *et al.* (2007) induziram a obesidade em gatos com dieta rica em ácido graxo esterificado e observaram que o desenvolvimento da obesidade nesta espécie está correlacionado a um aumento significativo do T4L, no entanto dentro da faixa de referência normal, discordando dos achados observados no presente estudo em que foi observado um aumento nos valores médios do T4L após a inserção de uma dieta hipocalórica e rica em fibras.

Quando comparadas as médias dos valores no tempo 0 e tempo 1 não foi observado diferença, discordando de Nannipieri *et al.* (2009) que afirmaram que a perda de peso reverte as mudanças sanguíneas neste sentido, vários estudos sugerem que a disfunção do tecido adiposo é o principal responsável pelas mudanças na homeostasia dos hormônios tireoidianos.

### 6.2.3 Peroxidação lipídica e insulina

Estudos têm demonstrado que os níveis de MDA, frequentemente medido como TBARS, são elevados em associação com fatores de risco cardiovascular, hipertensão, hiperlipidemia e diabetes (Walter *et al.*, 2004). No presente estudo todos os animais obesos avaliados apresentaram valores de TBARS elevados e, estes animais, após período de restrição calórica, obtiveram diminuição significativa dos valores de TBARS. Todos os animais estavam obesos há pelo menos 1 ano, o que é muito importante, tanto o grau de obesidade como o período de tempo no estado obeso, pois isso têm sido apontado como fatores importantes para a geração de estresse oxidativo.

Sugere-se, a partir deste estudo, que o emagrecimento afeta, de forma benéfica, a peroxidação lipídica do sangue. Himberta *et al.* (2017) afirmaram que o emagrecimento, através de dieta, exercício ou cirurgia bariátrica, reduziu o estresse oxidativo em pessoas obesas e estes parâmetros foram evidenciados pela diminuição dos níveis de 8-isoprostano, malondialdeído e aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Kil e Swanson (2010), afirmaram que o excesso de gordura corporal é responsável pela desregulação da produção das adipocinas e Oliver *et al.* (2010) e Tran *et al.* (2012) demonstraram que em pacientes obesos as vias de sinalização que

regulam a expressão de citocinas, também são ativadas no estresse oxidativo e este poderia ser uma fator que gerou nos pacientes do estudo aumento do TBARS com redução após um PPP.

Após a realização de um rápido PPP não foi constatado uma redução significativa nos níveis de glicemia e talvez, uma possível explicação para este achado pode ser o grau de obesidade dos animais incluídos no estudo e também o curto período de tempo para o emagrecimento e para as avaliações no tempo 1 não sendo possível a normalização dos parâmetros, sendo os mesmos achados descritos por Brunetto *et al.* (2010).

Considerando os valores de insulina em que na análise dos valores médios no tempo 0 e 1 não foi observado redução dos valores e tão pouco diferença significativa após o PPP, como observado em estudos com cães obesos submetidos a emagrecimento em que a insulina antes do emagrecimento apresentava-se aumentada com posterior redução após o PPP (TVARIJONAVICIUTE *et al.*, 2012b). No entanto o presente estudo foi realizado por um período de 8 semanas e os pacientes inseridos no estudo não atingiram o peso ideal, sendo este o provável motivo para uma ausência de diferença nas concentrações de insulina entre os tempos 0 e 1.

Considerando os valores individuais de II, RI:GC e HOMA foi observado indicadores de alterações com aumento em 30% dos pacientes. Vale ressaltar que existem poucos trabalhos na literatura com os índices de sensibilidade o que dificulta a interpretação (PÖPPL *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2017), contudo a comparação com os valores referenciados deixa claro a aplicabilidade destes índices adaptados da medicina. Quando analisado os índices de sensibilidade insulínica como II, RI:GC e HOMA não foi observado diferença significativa quando comparado os tempos 0 e 1, salientando que o método padrão ouro para avaliação de sensibilidade insulínica são os *clamps* normoglicêmicos e hiperinsulinêmicos (BERGMAN *et al.*, 1979) no entanto este método esbarra em limitações éticas.

Não houve correlação entre a variável TBARS e marcadores de resistência insulínica (II, RI:GC, HOMA) e estes achados discordam de estudos realizados em pessoas que demonstraram que espécies reativas de oxigênio podem causar um aumento nas adipocinas pró-inflamatórias (URAKAWA *et al.*, 2003; FURUKAWA *et al.*, 2004; SUBAUSTE e BURANT, 2007) e diminuem a expressão do gene de adiponectina, o que contribui para a resistência à insulina (FURUKAWA *et al.*, 2004).



#### 6.2.4 Parâmetros renais

O presente estudo é o primeiro a caracterizar valores de SDMA em cadelas obesas não azotemicas, antes e depois de um rápido PPP. Com os resultados foi possível observar redução dos valores de SDMA após um curto PPP.

Neste estudo foi observado que ao final de 2 meses os valores de SDMA reduziram em 80% dos animais e uma das prováveis justificativas é que o alimento fornecido no PPP possui substâncias com ações antioxidantes, além da provável redução de citocinas associadas ao emagrecimento. Feliers *et al.* (2015) afirmaram que a SDMA não é somente um metabólito inerte da arginina excretado pelos rins. Segundo os autores a SDMA contribui para o estresse oxidativo no endotélio renal por alterar a função das células endoteliais através da ruptura da estabilidade do dímero da óxido nítrico sintase (eNOS), induzindo assim a uma mudança na atividade enzimática da óxido nítrico sintase e na produção de NO disponível para a geração de ânions superóxido, o que poderia contribuir para disfunção do endotélio e progressão da DRC. Em humanos é comprovado que o aumento de substâncias oxidantes no sangue/nos rins/na urina ocasiona um declínio na função renal (HALL *et al.*, 2016b).

É comum os cães obesos apresentarem alteração do perfil lipídico, que são amenizadas com a perda de peso (TVARIJONAVICIUTE *et al.*, 2012b). A hiperlipidemia, nos obesos está diretamente relacionada a distúrbio no metabolismo das lipoproteínas, seja por aumento na sua produção ou diminuição da sua degradação (WREN *et al.*, 2007; JERICÓ, 2011). Quando comparada a hipercolesterolemia com a albuminúria, não foi constatado correlação estatística. No entanto Furrow *et al.* (2016) afirmaram que a nefrotoxicidade lipídica é um achado comum em pessoas e ratos e um achado pouco descrito na literatura veterinária. Estes pesquisadores realizaram um estudo e afirmaram que existe uma possível relação da hipercolesterolemia induzindo lesão glomerular em cães assim como em humanos.

A albuminúria no estudo foi um achado presente em 42,8% dos pacientes avaliados, segundo Eiamthanasinchai *et al.* (2013) demonstraram uma frequência de microalbuminúria de 28% em um grupo de 86 pessoas obesas. Quando comparado a albuminúria nos tempos 0 e 1 não foi constatado diferença significativa, o que

discordou de Shen *et al.* (2010) em que após o emagrecimento de 63 pessoas, 51,33% destas reduziram a proteinúria. A provável ausência de redução da proteinúria pode estar vinculada ao programa rápido de emagrecimento e a qualidade da dieta instituída, uma vez que o alimento possui níveis proteicos superiores a outros alimentos. German *et al.* (2015) afirmam que os cães em programa de emagrecimento tem maior exigência nutricional e um aumento da excreção urinária de aminoácidos e esta situação pode estar vinculada a uma perpetuação da proteinúria observada no estudo.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições apresentadas na primeira abordagem que as alterações metabólicas da obesidade em cães, podem estar envolvidas com a produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  produzida pelo tecido adiposo visceral hipertrofiado, assim como observada em humanos.

Na segunda abordagem foi possível concluir que as cadelas obesas apresentam propensão para peroxidação lipídica e após a instituição de um rápido programa de perda de peso ocorreu uma redução de ambos os parâmetros TBARS e SDMA, podendo existir entre eles, uma relação do estado crônico de inflamação, provocado pela obesidade promovendo estresse oxidativo e produção de radicais livres.

Sugere-se a necessidade de mais estudos para comprovar uma relação do estado crônico de inflamação, provocado pela obesidade promovendo estresse oxidativo e produção de radicais livres, o que pode ocasionar resistência insulínica e que parâmetros como SDMA e TBARS poderiam representar marcadores importantes e precoces de alterações fisiopatológicas da obesidade.

## REFERÊNCIAS

ABBASIANA, M.; DELVARIANZADEHB, M.; EBRAHIMIC, H.; KHOSRAVID, F.; NOUROZIA, P. Relationship between serum levels of oxidative stress and metabolic syndrome components. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 2018.

ALDRIDGE, C.; BEHREND, E. N.; KEMPPAINEN, R. J.; LEE-FOWLER, T. M.; MARTIN, L. G.; WARD, C. R.; BRUYETTE, D.; PANNU, J.; GAILLARD, P.; LEE, H. P. Comparison of 2 doses for ACTH stimulation testing in dogs suspected of or treated for hyperadrenocorticism. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 30, p. 1637-1641, 2016.

AMARAL, A. R.; BRUNETTO, M.; BRÓLIO, M. P.; CIMA, D. S.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, J. P.; AMBRÓSIO, C. E. Abnormal carbohydrate metabolism in a canine model for muscular dystrophy. **Journal of Nutritional Science**, v. 6, p. 1-6, 2017.

BALDISSEROTTO, M.; DAMIANI, D.; COMINATO, L.; FRANCO, R.; LAZARETTIA, A.; CAMARGO, P.; MARQUES, F.; MATTIELLO, R.; CERRI, G.; SANTANA, J.C. Subcutaneous fat: A better marker than visceral fat for insulin resistance in obese adolescents. **E-SPEN Journal**, v. 8, p. 251-255, 2013.

BARMA, P.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, A.; KUNDU, R.; DASGUPTA, S.; BISWAS, A.; BHATTACHARYA, S.; ROY, S. S.; BHATTACHARYA, S. Lipid induced overexpression of NF- $\kappa$ B in skeletal muscle cells in linked to insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 3, p. 190-200, 2009.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa no organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BERGMAN, R. N.; IDER, Y. Z.; BOWDEN, C. R.; COBELLI, C. Quantitative estimation of insulin sensitivity. **American Journal of Physiology**, v. 236, n. 6, p. E667-E677, 1979.

BONZÓN-KULICHENKO, E.; MOLTÓ, E.; PINTADO, C.; FERNÁNDEZ, A.; ARRIBAS, C.; SCHWUDKE, D.; GALLARDO, N.; SHEVCHENKO, A.; ANDRÉS, A. Changes in visceral adipose tissue plasma membrane lipid composition in old rats are associated with adipocyte hypertrophy with aging. **The Journals of Gerontology: Series A**, 2018.

BRAFF, J.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; ELLIOTT, J.; YERRAMILLI, M. Relationship between serum symmetric dimethylarginine concentration and glomerular filtration rate in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, p. 1699-1701, 2014.

BRENNAN, C. L.; HOENIG, M. GLUT4 but not GLUT1 expression decreases early in the development of feline obesity. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 26, n. 4, p. 291-301, 2004.

BROWN, S. A. Symmetric dimethylarginine (SDMA): New biomarker of renal function in cats and dogs. **International Renal Interest Society**, p. 1-2, 2015. Disponível em: <[http://www.iris-kidney.com/emerging-theme/emerging\\_theme\\_index.html](http://www.iris-kidney.com/emerging-theme/emerging_theme_index.html)>. Acesso em: 29 mai. 2018.

BRUNETTO, M. A.; NETO, G. B. P.; GOMES, M. O. S.; TESHIMA, E.; CARCIOFE, A. C. Alterações clínicas associadas a obesidade em cães. **MEDVEP**, v. 8, n. 25, p. 257-262, 2010.

BURKHOLDER, W. J.; TOLL, P. W. Obesidad. In: HAND, M. S. **Nutrición clínica en pequeños animales**. 4. ed. Argentina: Inter-Médica S.A.I.C.I., 2000.

CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **Journal of Endocrinology**, v. 220, p. 147-159, 2014.

CARCIOFI, A. C.; GONÇALVES, K. N. V.; VASCONCELLOS R. S.; BAZOLLIII R. S.; BRUNETTO, M. A.; PRADA, F. A weight loss protocol and owners participation in the treatment of canine obesity. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1331-1338, 2005.

CASTRO, G.; AREIAS, M. F. C.; WEISSMANN, L.; QUARESMA, P. G. F.; KATASHIMA, C. K.; SAAD, M. J. A.; PRADA, P. O. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. **FEBS Open Bio**, v. 3, n. 1, p. 443-449, 2013.

CIANCIOLO, R. E.; MOHR, F. C.; ARESU, L.; BROWN, C. A.; JAMES, C.; JANSEN, J. H.; SPANGLER, W. L.; VAN DER LUGT, J. J.; KASS, P. H.; BROVIDA, C.; COWGILL, L. D.; HEIENE, R.; POLZIN, D. J.; SYME, H.; VADEN, S. L.; VAN DONGEN, A. M.; LEES, G. E. World small animal veterinary association renal pathology initiative: Classification of glomerular diseases in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 1, p. 113-135, 2016.

CLARK, M.; HOENING, M. Metabolic effects of obesity and its interaction with endocrine diseases. **Veterinary Clinic Small Animal**, v. 46, p. 797-815, 2016.

CLINE, M. G.; LAUTEN, S.; COX, S.; BARTGES, J. W. The relationship between obesity and markers of oxidative stress in dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 2, p. 141-142, 2009.

CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ-DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic kidney disease. **Veterinary Records**, v. 164, n. 16, p. 487-490, 2009.

DALL'ASTA, C.; PAGANELLI, M.; MORABITO, A.; VEDANI, P.; BARBIERI, M.; PAOLISSO, G.; FOLLI, F.; PONTIROLI, A. E. Weight loss through gastric banding: Effects on TSH and thyroid hormones in obese subjects with normal thyroid function. **Obesity**, v. 18, n. 4, p. 854-857, 2010.

DAMINET, S.; JEUNETTE, I.; DUCHATEAU, L.; DIEZ, M.; VAN DE MAELE, I.; DE RICK, A. Evaluation of thyroid function in obese dogs and in dogs undergoing a weight loss protocol. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, v. 50, p. 213-218, 2003.

DASU, M. R.; JIALAL, I. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via toll-like receptors. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 300, p. 145-154, 2010.

DUCLOS, M.; PEREIRA P. M.; BARAT, P.; GATTA, B.; ROGER, P. Increased cortisol bioavailability, abdominal obesity, and the metabolic syndrome in obese women. **Obesity Research**, v. 13, n. 7, p. 1157-1166, 2005.

EIAMTHANASINCHAI, S.; LAOWAHUTANONT, N.; YAMWONG, P.; TEERAPORNLERTRATT, T. Prevalence and factors associated with microalbuminuria and abnormal renal function in Thai obese adults. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 2, p. 9-16, 2013.

EMRICH, I. E., ZAWADA, A. M., MARTENS-LOBENHOFFER, J.; FLISER, D.; WAGENPFEIL, S.; HEINE, G. H.; BODE-BÖGER, S. M. Symmetric dimethylarginine (SDMA) outperforms asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other methylarginines as predictor of renal and cardiovascular outcome in non-dialysis chronic kidney disease. **Clinical Research in Cardiology**, v. 107, n. 3, p. 201-213, 2018.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, C. E. **Veterinary internal medicine: Diseases of the dog and cat**. 7. ed., v. 1. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010.

FELIERS, D.; LEE, D. Y.; GORIN, Y.; BALAKUNTALAM, S. Symmetric dimethylarginine alters endothelial nitric oxide activity in glomerular endothelial cells. **Cellular Signalling**, v. 27, p. 1-5, 2015.

FERGUSON, D. C.; CAFFALL, Z.; HOENIG, M. Obesity increases free thyroxine proportionally to nonesterified fatty acid concentrations in adult neutered female cats. **Journal of Endocrinology**, v. 194, n. 2, p. 267-273, 2007.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 247-254, 2003.

FINUCANE, O. M.; REYNOLDS, C. M.; MCGILLICUDDY, F. C.; HARFORD, K. A.; MORRISON, M.; BAUGH, J.; ROCHE, H. M. Macrophage migration inhibitory factor deficiency ameliorates high-fat diet induced insulin resistance in mice with reduced adipose inflammation and hepatic steatosis. **PlosOne**, v. 9, p. 1-14, 2014.

FONTENELLE, L. C.; FEITOSA, M. M.; SEVERO, J. S.; FREITAS, T. E. C.; MORAIS, J. B. S.; TORRES-LEAL, F. L.; HENRIQUES, G. S.; NASCIMENTO, M. D. Thyroid function in human obesity: Underlying mechanisms. **Hormone and Metabolic Research**, v. 48, p. 787-794, 2016.

FURROW, E.; JAEGER, J. Q.; PARKER, V. J.; HINCHCLIFF, K. W.; JOHNSON, S. E.; MURDOCH, S. J.; DE BOER, I. H.; SHERDING, R. G.; BRUNZELL, J. D. Proteinuria and lipoprotein lipase activity in Miniature Schnauzer dogs with and without hypertriglyceridemia. **The Veterinary Journal**, v. 212, p. 83-89, 2016.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p.1752-1761, 2004.

GAYET, C.; BAILHACHE, E.; DUMON, H.; MARTIN, L.; SILIART, B.; NGUYEN, P. Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNF- $\alpha$ , IGF-1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, p. 157-165, 2004.

GERMAN, A. J.; HOLDEN, S. L.; BISSOT, T.; HACKETT, R. M.; BOURGE, V. Dietary energy restriction and successful weight loss in obese client-owned dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 1174-1180, 2007.

GERMAN, A. J.; RYAN, V. H.; GERMAN, A. C.; WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 185, p. 4-9, 2010.

GERMAN, A. J.; HERVERA, M.; HUNTER, L.; HOLDEN, S. L.; MORRIS, P. J.; BOURGE, V.; TRAYHURN, P. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 214-226, 2009.

GERMAN, A. J.; HOLDEN, S. L.; SERISISTER, S.; QUEAU, Y.; BOURGE, V. Assessing the adequacy of essential nutrient intake in obese dogs undergoing energy restriction for weight loss: A cohort study. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 253-263, 2015.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiology Behaviour**, v. 94, p. 206-218, 2008.

GRAUER, G. F. Measurement, interpretation, and implication of proteinuria and albuminuria. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 37, p. 283-295, 2007.

GRAUER, G. F. Proteinuria: Measurement and interpretation. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 121-127, 2011.

GUEDES, A. M.; CABRITA, A.; PINHO, A. T.; SILVA, A. P.; LOPES, A.; SANTOS, V.; NEVESO, P. L. O risco renal da obesidade. **Acta Medica Portuguesa**, v. 23, n. 5, p. 853-858, 2010.

GUESS, S. C. Symmetric dimethylarginine: A novel renal biomarker. Tese (Doutorado em Ciências) – Kansas State University, Manhattan, 2016.

GUILLAUME-GENTIL, C.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; ABRAMO, F.; BESTETTI, G. E.; ROSSI, G. L.; JEANRENAUD, B. Abnormal regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the genetically obese fa/fa rat. **Endocrinology**, v. 126, p. 1873-1879, 1990.



GUIMARÃES, A. L. N.; TUDURY, E. A. Etiologias, consequências e tratamentos de obesidades em cães e gatos – Revisão. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 1, p. 29-41, 2006.

HALL, J. A.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; ALMES, K.; JEWELL, D. E. Serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine in dogs with naturally occurring chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, p. 794-802, 2016a.

HALL, J. A.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; JEWELL, D. E. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, p. 1676-1683, 2014.

HALL, J. A.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; MELENDEZ, L. D.; JEWELL, D. E. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 808-812, 2015.

HALL, J. A.; MACLEAY, J.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; SCHIEFELBEIN, H.; PAETAU-ROBINSON, I.; JEWELL, D. E. Positive impact of nutritional interventions on serum symmetric dimethylarginine and creatinine concentrations in client-owned geriatric dogs. **PlosOne**, v. 11, n. 4 p. 1-16, 2016b.

HAMPER, B. Current topics in canine and feline obesity. **Veterinary Clinic Small Animal**, v. 46, p. 785-795, 2016.

HENEGER, J. R.; BIGLER, S. A.; HENEGER, L. K.; TYAGI, S. C.; HALL, J. E. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, p. 1211-1217, 2001.

HERRING, I. P.; PANCIERA, D. L.; WERRE, S. R. Longitudinal prevalence of hypertension, proteinuria, and retinopathy in dogs with spontaneous diabetes mellitus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 488-495, 2014.

HIMBERTA, C.; THOMPSON, H.; CORNELIA, M. U. Effects of intentional weight loss on markers of oxidative stress, DNA repair and telomere length – A systematic review. **Obesity Facts**, v. 10, p. 648-665, 2017.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, p. 87-91, 1993.

JACOB, F.; POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; NEATON, J. D.; LEKCHAROENSUK, C.; ALLEN, T. A.; KIRK, C. A.; SWANSON, L. L. Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 3, p. 322-329, 2003.

JERICÓ, M. M. Obesidade e hiperlipidemias. **Vets Today**, n. 5, 2011.

KABIR, M.; STEFANOVSKI, D.; HSU, I. R.; IYER, M.; WOOLCOTT, O. O.; ZHENG, D.; KATALANO, K. J.; CHIU, J. D.; KIM, S. P.; HARRISON, L. N.; IONUT, V.; LOTTATI,

M.; BERGMAN, R. N.; RICHEY, R. M. Large size cells in the visceral adipose depot predict insulin resistance in the canine model. **Obesity**, v. 19, n. 11, p. 2121-2129, 2011.

KERSHAW, E. E; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, p. 2548-2556, 2004.

KIL, D. Y.; SWANSON, K. S. Endocrinology of obesity. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, p. 205-219, 2010.

KRANENDONK, M. E. G.; HERWAARDEN, J. A. V.; STUPKOVA, T.; JAGER, W.; VINK, A.; MOLL, F. L.; KALKHOVEN, E.; VISSEREN, F. L. J. Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depots relate differently to metabolic risk factors for cardiovascular disease: Distinct fat depots and vascular risk factors. **Atherosclerosis**, v. 239, p. 419-427, 2015.

KURYSZKO, J.; SŁAWUTA, P.; SAPIKOWSKI, G. Secretory function of adipose tissue. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 2, p. 441-446, 2016.

LAFLAMME, D. P. Companion animals symposium: Obesity in dogs and cats: What is wrong with being fat? **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 1653-1662, 2015.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice**, v. 22, p. 10-15, 1997.

LEE, M. J.; WU, Y.; FRIED, S. K. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, p. 1-11, 2012.

LEES, G. E.; BROWN, S. A.; ELLIOT, J.; GRAUER, G. E.; VADEN, S. L. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 377-385, 2005.

LIEN, Y. H.; HSIANG, T. Y.; HUANG, H. P. Associations among systemic blood pressure, microalbuminuria and albuminuria in dogs affected with pituitary and adrenal dependent hyperadrecorticisism. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, p. 61-66, 2010.

LIU, L.; FANG, C.; YANG, J.; ZHANG, H.; HUANG, Y.; XUAN, C.; WANG, Y.; LI, S.; SHA, J.; ZHA, M.; GUO, M. The effect of noise exposure on insulin sensitivity in mice may be mediated by the JNK/IRS1 pathway. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1-8, 2018.

LIVINGSTONE, D. E.; KENYON, C. J.; WALKER, B. R. Mechanisms of dys-regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese Zucker rats. **Journal of Endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 533-539, 2000.

LORDELO, R. A.; MANCINI, M. C.; CERCARTO, C.; HALPERN, A. Eixos hormonais na obesidade: Causa ou efeito? **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v. 51, n. 1, p. 34-41, 2007.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 175-184, 2007.

LUND, E. M.; ARMSTRONG, P. J.; KIRK, C. A.; KLAUSNER, J. S. Prevalence and risk factors for obesity in adult cats from private US veterinary practices. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 3, p. 88-95, 2005.

LUND, E. M.; ARMSTRONG, P. J.; KIRK, C. A.; KLAUSNER, J. S. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. **Journal of Applied Research Veterinary Medicine**, v. 4, p.177-186, 2006.

MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: Causes and therapeutic strategies. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 13, n. 10, p. 423-444, 2015.

MARTIN, L. J. M.; SILIART, B.; DUMON, H. J. W.; NGUYEN, P. G. Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, p. 355-360, 2006.

MASUZAKI, H.; PATERSON, J.; SHINYAMA, H.; MORTON, N. M.; MULLINS, J. J.; SECKL, J. R.; FLIER, J. S. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. **Science**, v. 294, p. 2166-2170, 2001.

MATTIOLI, T. M. F.; NORONHA, L.; LIMA, A. A. S.; GRÉGIO, A. M. T.; MACHADO, M. A. N.; AZEVEDO, M. L. V.; MARTINS, A. P. C.; AZEVEDO-ALANIS, L. R. Utilização de brocas trefina para a confecção de tissue microarray. **Archives of Oral Research**, v. 7, p. 161-167, 2011.

MAYER, C. M.; BELSHAM, D. D. Central insulin signaling is attenuated by long-term insulin exposure via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation, proteasomal degradation, and lysosomal insulin receptor degradation. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 75-84, 2010.

MOROOKA, T.; NIIYAMA, M.; UCHIDA, E.; UEMURA, M.; MIYOSHI, K.; SAITO, M. Measurement of the back fat layer in beagles for estimation of obesity using two-dimensional ultrasonography. **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, p. 56-59, 2001.

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

MURGIER, P.; JAKINS, A.; BEXFIELD, N.; ARCHER, J. Comparison of semiquantitative test strips, urine protein electrophoresis, and an immunoturbidimetric assay for measuring microalbuminuria in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 485-492, 2009.

NABITY, M. B.; LEES, G. E.; BOGGES, M. M.; YERRAMMILI, M.; OBARE, E.; RAKITIN, A.; AGUIAR, J.; RELFORD, R. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 1036-1044, 2015.

NANNIPIERI, M.; CECCHETTI, F.; ANSELMINO, M.; CAMASTRA, S.; NICCOLINI, P.; LAMACCHIA, M.; ROSSI, M.; IERVASI, G.; FERRANNINI, E. Expression of thyrotropin and thyroid hormone receptors in adipose tissue of patients with morbid obesity and/or type 2 diabetes: effects of weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 33, p. 1001-1006, 2009.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-312, 2001.

ÖBERG, J.; FALL, T.; LILLIEHO, I. Validation of a species-optimized enzyme-linked immunosorbent assay for determination of serum concentrations of insulin in dogs **Vet Clin Pathol**, v. 40, n. 1, p. 66-73, 2011.

OLIVIER, S. R.; ROSA, J. S.; MILNE, G. L. Increased oxidative stress and altered substrate metabolism in obese children. **International Journal of Pediatric Obesity**, v. 5, n. 5, p. 436-444, 2010.

PANVELOSKI-COSTA, A. C.; SERRANO-NASCIMENTO, C.; BARGI-SOUZA, P.; POYARES, L. L.; VIANA, G. S.; NUNES, M. T. Beneficial effects of thyroid hormone on adipose inflammation and insulin sensitivity of obese Wistar rats. **Physiological Reports**, v. 6, n. 3, p. 1-11, 2018.

PASQUALI, R.; GAMBINERI, A.; PAGOTTO, U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 113, n. 10, p. 1148-1159, 2006.

PASQUALI, R.; CANTOBELLI, S.; CASIMIRRI, F.; CAPELLI, M.; BORTOLUZZI, L.; FLAMIA, R.; LABATE, A. M.; L BARBARA, L. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obese women with different patterns of body fat distribution. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, n. 2, p. 341-346, 1993.

PAULA, R. B.; FERNANDES, N.; CARMO, V. M. P.; ANDRADE, L. C. F. A.; BASTOS, M. G. Obesidade e doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 28, n. 3, p. 158-164, 2006.

PESSINA, P.; FERNANDEZ-FOREN, A.; CUETO, E.; DELUCCHI, L.; CASTILLO, V.; MEIKLE, A. Cortisol secretion alter adrenocorticotrophin (ACTH) and dexamethasone tests in healthy female and male dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 33-38, 2009.

PÖPPL, A. G.; LASTA, C. S.; GONZÁLEZ, F. H. D.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA R. S. M. Insulin sensitivity indexes in female dogs: Effect of estrus cycle and pyometra. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 341-350, 2009.

RADA, I.; DELDICQUE, L.; FRANCAUX, M.; ZBINDEN-FONCEA, H. Toll like receptor expression induced by exercise in obesity and metabolic syndrome: A systematic review. **Exercise Immunology Review**, v. 24, p. 60-71, 2018.

RAFAJ, R. B.; KULEŠ, J.; MARINCULIĆ, A.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J.; MIHALJEVIĆ, Z.; TUMPA, A.; MRLJAK, V. Plasma markers of inflammation and

hemostatic and endothelial activity in naturally overweight and obese dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 13, p. 1-7, 2017.

RAMSEY, I.; HOLDEN, S. Advances in the management of obesity in dogs. **Veterinary Nursing Journal**, v. 24, n. 1, p. 16-24, 2010.

REGO, A. B. A. S. **Microalbuminúria em cães com insuficiência renal crônica: relação com pressão sanguínea sistêmica**. 108 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RELFORD, R.; ROBERTSON, J.; CLEMENTS, C. Symmetric dimethylarginine: Improving the diagnosis and staging of chronic kidney disease in small animals. **Veterinary Clinics Small Animal**, v. 46, p. 941-960, 2016.

RODRIGUEZ, A. C. I.; EPEL, E. S.; WHITE, M. L.; STANDEN, E. C.; SECKL, J. R.; TOMIYAMA, A. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. **Psychoneuroendocrinology**, v. 62, p. 301-318, 2015.

ROELFSEMA, F.; KOK, P.; FROLICH, M.; PEREIRA, A. M.; PIJL, H. Disordered and increased adrenocorticotropin secretion with diminished adrenocorticotropin potency in obese premenopausal women. **Journal Clinical Endocrinology Metabolic**, v. 94, n. 8, p. 2991-2997, 2009.

RYAN, H. V.; GERMAN, A. J.; WOOD, I. S.; HUNTER, L.; MORRIS, P.; TRAYHURN, P. Adipokine expression and secretion by canine adipocytes: stimulation of inflammatory adipokine production by LPS and TNF- $\alpha$ . **European Journal of Physiology**, v. 460, p. 603-616, 2010.

SANTINI, F.; MARZULLO, P.; ROTONDI, M.; CECCARINI, G.; PAGANO, L., IPPOLITO, S.; CHIOVATO, L.; BIONDI, B. The crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: Signal integration in health and disease. **European Journal of Endocrinology**, v. 171, p. R137-R152, 2014.

SAVINI, I.; CATANI, M.V.; EVANGELISTA, D.; GASPERI, V.; AVIGLIANO, L. Obesity associated oxidative stress: Strategies finalized to improve redox state. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 10497-10538, 2013.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHWEDHELM, E.; BÖGER, R. H. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 5, p. 275-85, 2011.

SECKL, J. R. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenases: Changing glucocorticoid action. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 597-602, 2004.

SEN, Y.; AYGUN, D.; YILMAZ, E.; AYAR, A. Children and adolescents with obesity and the metabolic syndrome have high circulating cortisol levels. **Neuro Endocrinology**, v. 29, p.141-145, 2008.

SERRA, D.; MERA, P.; MALANDRINO, M. I.; MIR, J. F.; HERRERO, L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, p. 269-284, 2013.

SHEN W. W.; CHEN, H.; CHEN, H.; XU, F.; LI, L.; LIU, Z. Obesity-related glomerulopathy: Body mass index and proteinuria. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 8, p. 1401-1409, 2010.

SHUSTER, A.; PATLAS, M.; PINTHUS, J.H.; MOURTZAKIS, M. The clinical importance of visceral adiposity: A critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. **The British Journal of Radiology**, v. 85, p. 1-10, 2012.

SIEBER-RUCKSTUHL, N. S.; BURKHARDT, W. A.; HOFER-INTEEWORN, N.; RIOND, B.; RAST, I. T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; REUSCH, C. E.; BORETTI, F. S. Cortisol response in healthy and diseased dogs after stimulation with a depot formulation of synthetic ACTH. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 1541-1546, 2015.

SIES H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SILVA, A. C. R. A.; ALMEIDA, B. F. M.; SOEIRO, C. S.; FERREIRA, W. L.; LIMA, V. M. F.; CIARLINI, P. C. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, p. 136-141, 2013.

SKURK, T.; ALBERTI-HUBER, C.; HERDER, C.; HAUNER, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, p. 1023-1033, 2007.

SMITH, S. R. The endocrinology of obesity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 25, p. 921-942, 1996.

SODER, J.; WERNERSSON, S.; HAGMAN, R.; KARLSSON, I.; MALMLOEF, K.; HOEGLUND, K. Metabolic and hormonal response to a feed-challenge test in lean and overweight dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, p. 574-582, 2016.

SUBAUSTE, A. R.; BURANT, C. F. Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 293, p. 159-164, 2007.

TAIN, Y. L.; HSU, C. N. Interplay between oxidative stress and nutrient sensing signaling in the developmental origins of cardiovascular disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 4, p. E841-E855, 2017.

TENK, J.; MATRAI, P.; HEGYI, P.; ROSTAS, I.; GARAMI, A.; SZABO, I.; SOLYMA, M.; PETERVARI, E.; CZIMMER, J.; MARTA, K.; MIKO, A.; FUREDI, N.; PARNICZKY, A.; ZSIBORAS, C.; BALASKO, M. Obesity, HPA axis activity does not increase with



BMI, but declines with aging: A meta-analysis of clinical studies. **PlosOne**, v. 11, n. 11, p. 1-18, 2016.

TRAN, B.; OLIVER, S.; ROSA, J.; GALASSETTI, P. Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: An overview of ten years of studies. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J. J.; HOLDEN, S. L.; BIOURGE, V.; MORRIS, P. J.; GERMAN, A. J. Effect of weight loss in obese dogs on indicators of renal function or disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 31-38, 2013.

TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J. J.; HOLDEN, S. L.; CUTHBERTSON, D. J.; BIOURGE, V.; MORRIS, P. J.; GERMAN, A. J. Obesity related metabolic dysfunction in dogs: A comparison with human metabolic syndrome **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 147-154, 2012a.

TVARIJONAVICIUTE, A.; TECLES, F.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERON, J. J. Effect of weight loss on inflammatory biomarkers in obese dogs. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 556-558, 2012b.

URAKAWA, H.; KATSUKI, A.; SUMIDA, Y.; GABAZZA, E. C.; MURASHIMA, S.; MORIOKA, K.; MARUYAMA, N.; KITAGAWA, N.; TANAKA, T.; HORI, Y.; NAKATANI, K.; YANO, Y.; ADACHI, Y. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, p. 4673-4676, 2003.

VALEDO, S. F.; VILA, B. R.; NIETO-VAZQUEZ, I.; LORENZO, M. C. Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor  $\alpha$  induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: Reversal by liver X receptor agonists. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3583-3593, 2009.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WAKI, M. F.; MARTORELLI, C. R.; MOSKO, P. E.; KOGIKA, M. M. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos – Abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2226-2234, 2010.

WALTER, M. F.; JACOB, R. F.; JEFFERS, B.; GHADANFAR, M. M.; PRESTON, G. M.; BUCH, J.; MASON, P. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: A longitudinal analysis of the prevent study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, p. 1996-2002, 2004.

WEETH, L. P. Other risks/possible benefits of obesity. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 5, p. 843-853, 2016.

WEHNER, A.; HARTMANN, K.; HIRSCHBERGE, R, J. Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal disease. **The Veterinary Record**, v. 162, n. 5, p. 141-147, 2008.

WHITE, G. A.; WARD, L.; PINK C.; CRAIGON, J.; MILLAR, K. M. "Who's been a good dog?" Owner perceptions and motivations for treat giving. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 132, n. 15, p. 14-19, 2016.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**, v. 1, n. 313, p. 17-29, 1996.

WREN, J. A.; GOSSELLIN, J.; SUNDERLAND, S. J. Dirlotapide: A review of its properties and role in the management of obesity in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, p. 11-16, 2007.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

ZORAN, D. L. Obesity in dogs and cats: A metabolic and endocrine disorder. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 40, p. 221-239, 2010.



## ANEXO A – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA-PUCPR)



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Núcleo de Bioética  
Comitê de Ética no Uso de Animais

PUCPR

Curitiba, 20 de agosto de 2015.

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 805 1ª Versão

**TÍTULO DO PROJETO:** Interação do eixo hipotálamo hipófise adrenal com a resposta inflamatória e estresse oxidativo em cães obesos e com sobrepeso.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Carolina Zaghi Cavalcante

**EQUIPE DE PESQUISA:**

Marconi Rodrigues de Farias, Anita Nishiyama, Juliane Possebom de Oliveira, Bruna Duarte Pacheco, Andressa Thais Roncoski.

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**ESCOLA / CURSO:**

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Medicina Veterinária

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Cão – <i>Canis Familiaris</i>	Machos e Fêmeas	Menos de 18 anos e peso indefinido	B / Mediato	35

O colegiado do CEUA em reunião no dia 15/08/2013, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer:

**APROVADO.**

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª. Marta Luciane Fischer  
Coordenadora  
Comitê de Ética no Uso de Animais.

## ANEXO B – ESCALA DE CONDIÇÃO CORPORAL (ECC), ADAPTADA DE LAFLAMME, 1997

### MUITO MAGRO

**1**

- Costelas, vértebras lombares, ossos pélvicos e todas as proeminências ósseas evidentes à distância
- Nenhuma gordura corporal discernível
- Perda evidente de massa muscular

**2**

- Costelas, vértebras lombares e ossos pélvicos facilmente visíveis
- Ausência de gordura palpável
- Algumas proeminências ósseas visíveis à distância
- Perda mínima de massa muscular

**3**

- Costelas facilmente palpáveis, podendo ser visíveis na ausência de gordura palpável
- Extremidades superiores das vértebras lombares visíveis, com ossos pélvicos se tornando proeminentes
- Cintura evidente



### IDEAL

**4**

- Costelas facilmente palpáveis com uma camada mínima de gordura
- Cintura observada com facilidade na visão dorsoventral

**5**

- Costelas palpáveis sem camada excessiva de gordura
- Cintura observada na visão dorsoventral
- Abdome enxuto quando visto lateralmente



### SOBREPESO

**6**

- Costelas palpáveis com leve excesso de camada de gordura
- Cintura discernível na visão dorsoventral, mas não proeminente



### OBESO

**7**

- Costelas palpáveis com dificuldade pela presença excessiva de gordura
- Depósitos notáveis de gordura sobre a região das vértebras lombares e a base da cauda
- Cintura ausente ou quase imperceptível

**8**

- Costelas não palpáveis sob camada muito excessiva de gordura ou palpáveis apenas com compressão significativa
- Depósitos maciços de gordura sobre a região das vértebras lombares e a base da cauda
- Cintura ausente
- Possível presença de distensão abdominal evidente

**9**

- Depósitos maciços de gordura sobre o tórax, a coluna vertebral e a base da cauda
- Cintura ausente
- Depósitos de gordura no pescoço e nos membros
- Distensão abdominal evidente



**ANEXO C – VALORES INDIVIDUAIS DE BIOQUÍMICA SÉRICA DOS CÃES  
OBESOS SUBMETIDOS A OVARIOSALPINGOHISTERECTOMIA ELETIVA, NO  
QUAL FORAM COLETADOS FRAGMENTOS DE TECIDO ADIPOSO.**

<b>N.</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>FA (U/L)</b>	<b>Colesterol (mg/dL)</b>	<b>TRG. (mg/dL)</b>	<b>Glicemia (mg/dL)</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>
1	42,30	33,00	207,00	29,00	74,00	X
2	88,00	13,00	246,00	46,00	79,00	0,39
3	32,30	18,00	171,00	72,00	83,00	X
4	55,00	24,00	161,00	51,00	78,00	0,21
5	39,65	14,00	154,00	99,00	81,00	1,06
6	37,33	12,00	156,00	213,00	98,00	1,14
7	23,65	51,00	200,00	30,00	89,00	0,78
8	36,29	25,00	183,00	40,00	96,00	1,03
9	90,00	22,00	180,00	11,00	70,00	0,12

Nota: N. = número; ALT = alanina amino transferase; FA = fosfatase alcalina; TRG = triglicérides;  
X = não foram realizados.

**ANEXO D – VALORES INDIVIDUAIS DE BIOQUÍMICA SÉRICA DOS CÃES  
OBESOS SUBMETIDOS A PROGRAMA DE PERDA DE PESO, TEMPO 0.**

<b>N.</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>FA (U/L)</b>	<b>Colesterol (mg/dL)</b>	<b>TRG. (mg/dL)</b>	<b>Glicemia (mg/dL)</b>	<b>Frut.</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>
1	21,15	16,00	202,00	61,00	103,00	195,00	1,37
2	60,46	114,00	329,00	112,00	88,00	226,00	1,00
3	21,06	78,00	301,00	53,00	127,00	243,00	1,35
4	28,60	40,00	216,00	104,00	93,00	204,00	1,17
5	30,78	114,00	223,00	119,00	89,00	190,00	1,07
6	62,33	361,00	214,00	117,00	81,00	234,00	1,01
7	28,46	56,00	155,00	176,00	78,00	233,00	1,03
8	42,47	23,00	153,00	191,00	79,00	218,00	1,16
9	41,49	125,00	180,00	128,00	88,00	194,00	0,94
10	162,43	47,00	153,00	46,00	75,00	210,00	1,26

Nota: N. = número; ALT = alanina amino transferase; FA = fosfatase alcalina; TRG = triglicerídeos; Frut = frutosamina.

**ANEXO E – VALORES INDIVIDUAIS DE BIOQUÍMICA SÉRICA DOS CÃES  
OBESOS SUBMETIDOS A PROGRAMA DE PERDA DE PESO, TEMPO 1.**

<b>N.</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>FA (U/L)</b>	<b>Colesterol (mg/dL)</b>	<b>TRG. (mg/dL)</b>	<b>Glicemia (mg/dL)</b>	<b>Frut.</b>	<b>Creatinina (mg/dL)</b>
1	30,51	17,00	163,00	54,00	75,00	196,00	1,23
2	93,78	91,00	239,00	148,00	91,00	244,00	1,07
3	23,49	25,00	310,00	55,00	76,00	268,00	1,24
4	34,38	82,00	194,00	100,00	63,00	185,00	1,17
5	25,91	45,00	187,00	52,00	75,00	229,00	1,04
6	73,88	512,00	195,00	111,00	110,00	205,00	0,93
7	31,76	61,00	136,00	70,00	92,00	235,00	1,07
8	39,19	24,00	153,00	53,00	101,00	211,00	1,18
9	40,25	81,00	132,00	89,00	86,00	190,00	0,81
10	121,18	20,00	127,00	62,00	78,00	230,00	1,00

Nota: N. = número; ALT = alanina amino transferase; FA = fofatase alcalina; TRG = triglicerídeos; Frut = frutosamina.

## Research in Veterinary Science

### Immunoexpression of TNF- $\alpha$ in the visceral adipose tissue of obese female dogs: Possible factor in obesity?

Carolina Zaghi Cavalcante<sup>\*a,b</sup>, Rayane Sol Amaral Silva Sgarbossa<sup>a</sup>, Vanessa Cunningham Gmyterco<sup>a</sup>, Larissa Anuska Zeni Condas<sup>c</sup>, Jair Rodini Engracia Filho<sup>a</sup>, Marconi Rodrigues de Farias<sup>a</sup>, Anita Nishiyama<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Veterinary Medicine, School of Life Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, CEP 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil.*

<sup>b</sup> *Department of Physiology, Biological Sciences Division, Polytechnic Center, Federal University of Paraná, Avenida Coronel Francisco H. dos Santos, 100 - Jardim das Américas, CEP 80530-000, Curitiba, Paraná, Brazil.*

<sup>c</sup> *Independent Veterinarian, Rua Chile 1122, apartamento 2, bloco 10, Rebouças, CEP 80220-900, Curitiba, Paraná, Brazil.*

\* Corresponding author: Carolina Zaghi Cavalcante

E-mail: [carolina.cavalcante@pucpr.br](mailto:carolina.cavalcante@pucpr.br)

Telephone: +55xx41988826808



## 1. Introduction

The adipose tissue is a complex and metabolically active endocrine organ that expresses and secretes a variety of bioactive peptides known as adipokines (Xu et al., 2003). Among these bioactive peptides, a large number of serum cytokines and chemokines are involved in inflammation and insulin resistance, including TNF- $\alpha$  he adipose tissue is a complex and metabolical.

TNF- $\alpha$  was the first cytokine identified in the adipose tissue of obese rodents and is strongly correlated with metabolic inflammation and insulin resistance in laboratory animals (Hotamisligil et al., 1993); this correlation has also been drawn through analyzing the serum of obese dogs (German et al., 2009).

In fact, there is strong evidence for the association of TNF- $\alpha$ , insulin resistance, and ectopic fat deposition in obese humans. Moreover, TNF- $\alpha$  inhibits adipocyte differentiation factors and induces apoptosis, which causes both enlargement of the remaining adipocytes and changes in adipokine secretion. This in turn creates a predisposition to insulin resistance (Goossens, 2008). However, few studies have evaluated these associations in dogs.

Kabir et al. (2011) evaluated adipocyte size and distribution in obese dogs and observed that visceral adipocytes were larger than subcutaneous adipocytes, and that adipocyte hypertrophy was a predictive factor for insulin resistance. Moreover, both deposits of visceral and subcutaneous fat and adipocyte size are directly correlated with adipokine production and metabolic dysfunction in humans (Goossens, 2008; Lee et al., 2012; Shuster et al., 2012).

In view of the high rate of obesity and its metabolic consequences, the objective of this study was both to identify which adipose tissue compartment, subcutaneous or visceral, expressed more TNF- $\alpha$  in obese female dogs, and to



correlate the observed TNF- $\alpha$  production with adipocyte number, adipocyte size, and leukocyte infiltration. As reported in humans, we expect to find associations between hyperplasia and hypertrophy of visceral adipocytes in obese dogs. We also expect that these enlarged adipocytes lead to increased immunoexpression of TNF- $\alpha$ . This study may help elucidate the predictive factors for insulin resistance resulting from the increased release of inflammatory adipokines in dogs.

## **2. Materials and methods**

This study evaluated animals from the Veterinary School Clinic (*Clínica Veterinária Escola – CVE*) of the Pontifical Catholic University of Paraná (*Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR*), located in Curitiba, Paraná, Brazil. This work was approved by the PUCPR Animal Research Ethics Committee (Protocol No. 805). A total of 30 animals were evaluated over a 2-year period, with 17 animals meeting the inclusion criteria.

### **2.1 Animals**

This case-control study selected whole female dogs of different breeds and ages. Complete clinical examinations indicated that the animals were healthy and did not present clinical signs of concomitant diseases, including odontological, dermatological, cardiorespiratory, neurological, orthopedic, urogenital, gastrointestinal, autoimmune, neoplastic, or other endocrine diseases. In addition, dogs subjected to antibiotic, corticosteroid, and anti-inflammatory therapy for up to 3 months prior to experiments and dogs that used injectable or oral contraceptives for up to 6 months prior to experiments were excluded.

The study animals were classified according to the body condition score (BCS), which has been validated to evaluate the body condition of dogs by inspection and palpation; it is based on the numerical scales proposed by Laflamme (1997). All animals were classified by the same veterinarian.

This initial screening allowed the formation of two animal groups:

Obese group: nine whole females with a BCS of 9/9 (Laflamme, 1997);

Control group: eight non-obese whole females with a BCS of 5/9 (Laflamme, 1997).

## *2.2 Laboratory analysis*

Blood tests (blood count and serum biochemical analyses of albumin, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, urea, creatinine, glucose, triglycerides, and cholesterol) were conducted in all selected animals after a 12-hour fast. Blood samples were obtained by aseptic jugular venipuncture and were stored in bottles containing EDTA and clot activator. Further, they were processed in the clinical analysis laboratory of the PUCPR CVE.

## *2.3 Histopathology and Immunohistochemistry*

All study animals were subjected to elective ovariosalpingohysterectomy, in which samples of subcutaneous and visceral adipose tissues were collected by making an incision in the region near the linea alba and falciform ligament, respectively. One 2 cm<sup>3</sup>-sample was collected from each tissue. The samples were conditioned in 10% formalin and processed using the routine histological technique of the CVE PUCPR Histopathology Laboratory, with inclusion in paraffin and preparation of 4- $\mu$  sample was collected from each tissue. The samples were conditioned in 10% formalin and



retrieval, according to the manufacturer's instructions samples were incubated with the secondary antibody Advance™ (Dako, Glostrup, Denmark) for 15 min, according to the manufacturer's instructions. For visualizing the immunoreactions, the samples were incubated with chromogen DAB 1.1 (OriGene, Rockville, MD, USA) and then counterstained with Harris hematoxylin.

The slides were scanned using the Zeiss Axio Scan.Z1® scanner (Carl Zeiss) with a 20x objective and evaluated using the software ImagePro-Plus, version 4.5.0.29 for Windows 98/Nt/2000. For this purpose, an average of 30 images from each region was selected for each animal, excluding tissues with blood vessels and large interstitial tissue. The imaging software was used to create masks detailing immunopositivity and immunonegativity over the entirety of an image; these were applied to all images. Further, the mean percentage of immunopositive areas was calculated for each animal.

#### *2.4 Statistics*

Demographic frequency distributions were calculated for the dogs in this study. Data were analyzed using STATA, version 14 (College Station, Texas, USA). The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

The means of TNF- $\alpha$  expression, adipocyte size, and adipocyte number in subcutaneous and visceral tissues were compared between the healthy control and obese groups by the Mann Whitney *U*-test (Mann and Whitney, 1947). Meanwhile, the mean proportion of leukocyte infiltration in both sets of tissue was compared with the Chi-squared test (Miller and Siegmund, 1982).

The correlation between TNF- $\alpha$  expression in subcutaneous versus visceral tissue in both study groups was non-parametrically analyzed using Spearman's rank

correlation (Sperman, 1904). In addition, adipocyte number and adipocyte size were correlated to produced TNF- $\alpha$  in the subcutaneous and visceral tissue of each group.

### **3. Results**

#### *3.1 Epidemiology*

The mean age of the animals from the obese group was 4.9 years, ranging from 1 to 8 years. Of the nine animals included in this group, 77.7% (n=7) did not have a defined race and 22.2% (n=2) were of the Labrador breed. The mean age of the animals from the control group was 1.9 years, ranging from 7 months to 6 years. In this group, 62.5% did not have a defined breed, and three dogs were of the St. Bernard, Lhasa Apso, and Yorkshire breeds, respectively.

#### *3.2 Adipocyte size*

Subcutaneous and visceral adipocytes were significantly larger in obese animals (Table 1). However, there was no significant difference in the size of subcutaneous and visceral adipocytes within each group.

#### *3.3 Leukocyte infiltration*

Leukocyte infiltration was observed only in the subcutaneous and visceral tissues of obese animals; as such, there was a significant difference between the groups (p=0.03). Of all the analyzed animals, 44.4% (n=5) had leukocyte infiltration in either the subcutaneous or visceral adipose tissues; of these, 22.2% (n=2) presented infiltration in both tissues.

### 3.4 Adipocyte number

Healthy animals from the control group presented a higher adipocyte count than obese animals in both visceral and subcutaneous tissue. However, a significant difference was only detected in the visceral tissue of the control group, which presented a higher quantity of adipocytes (Table 1).

### 3.5 TNF- $\alpha$ immunoexpression

TNF- $\alpha$  immunoexpression was detected in both types of tissues in all subjects. Nevertheless, no significant difference was detected between healthy control group and obese animals (Table 1).

### 3.6 Correlation between TNF- $\alpha$ immunoexpression vs adipocyte size

TNF- $\alpha$  immunoexpression did not correlate with visceral tissue adipocyte size when considering all animals in the study as a whole. Nevertheless, in obese animals, a significant positive correlation was observed with a Spearman's correlation coefficient ( $\rho$ ) of 0.9 ( $p=0.0009$ ) was observed.

Likewise, no correlation was observed for subcutaneous adipocyte size, both when analyzing all subjects as a whole or each group individually.

### 3.7 Correlation between TNF- $\alpha$ immunoexpression vs leukocyte infiltration

Leukocyte infiltration was negatively correlated with TNF- $\alpha$  immunoexpression in subcutaneous and visceral tissue when considering all animals and groups. However, these variables were positively correlated in the obese group. Nevertheless, these correlations were not significant.

### 3.8 Correlation between TNF- $\alpha$ immunoexpression vs adipocyte number

TNF- $\alpha$  immunoexpression in subcutaneous tissue presented a positive significant correlation with adipocyte number for all animals. This significance was driven by the control group, in which a Spearman's correlation coefficient ( $\rho$ ) of 0.74 ( $p=0.03$ ) was observed.

In visceral tissue, a higher number of adipocytes was linked to a decrease in TNF- $\alpha$  immunoexpression, although this correlation was not significant. This effect was most prominent in control group.

**Table 1.** Mean value, standard deviation (SD), and 95% confidence interval of adipocyte size, adipocyte number, and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) expression, on subcutaneous and visceral adipose tissue for healthy-control and obese groups.

Variable	C Mean (SD) (n=8)	OB Mean (SD) (n=9)	p-value
Adipocyte size ( $\mu\text{m}$ )			
<b>Subcutaneous</b>	4779.5 ( $\pm$ 181.3)	7005.7 ( $\pm$ 434.7)	0.001
<b>Visceral</b>	4730.7 ( $\pm$ 261.12)	7448.4 ( $\pm$ 613.8)	0.001
Adipocyte number			
<b>Subcutaneous</b>	380.4 ( $\pm$ 55.4)	304.2 ( $\pm$ 56.7)	0.1
<b>Visceral</b>	551.2 ( $\pm$ 87.5)	282.9 ( $\pm$ 39.0)	0.009
TNF- $\alpha$ expression			
<b>Subcutaneous</b>	77.4 ( $\pm$ 5.4)	67.7 ( $\pm$ 3.9)	0.14
<b>Visceral</b>	70.7 ( $\pm$ 6.6)	72.0 ( $\pm$ 5.1)	1.0

Note: C: healthy control; OB: obese group.

#### 4. Discussion

The present study determined adipocyte number and size, presence of leukocyte infiltration, and the correlation of these factors with the immunoexpression of TNF- $\alpha$ . The present study determined adipocyte number and size, presence of leukocyte infiltration, and the correlation of these factors with the immunoexpression of TNF- $\alpha$  in the control group, in which a Spearman's correlation coefficient ( $\rho$ ) of 0.74 ( $p=0.03$ ) was observed (2011), who observed that adipocyte hypertrophy is the primary morphological change in the adipose tissue of obese individuals and is directly correlated with obesity-related chronic inflammation (Skurk et al., 2007).

There were no significant differences in the size of subcutaneous and visceral adipocytes in obese animals. However, Kabir et al. (2011) found that visceral adipocytes in obese dogs are larger than subcutaneous adipocytes. The difference between this study and the results observed herein might be due to the difference in the amount of time the subjects spent being obese. In fact, Lee et al. (2012) demonstrated that hypertrophy initially occurs in subcutaneous adipocytes and progresses to visceral adipocytes as obesity advances, leading to long-term adipocyte hypertrophy in both types of tissue.

While differences in adipocyte size are one element to consider, another important factor is the effect of the process of differentiating preadipocytes from adipocytes in determining the number of adipocytes. In this study, adipocyte density was higher in the visceral adipose tissue of female dogs with a normal BCS. This is likely because adipocytes were counted in a predetermined area (200 mm<sup>2</sup>) in both animal groups, whereas adipocyte hypertrophy was observed only in obese female dogs. However, the estimated absolute numbers suggest an increase in the number of adipocytes in obese animals, as previously observed by Kranendonk et al. (2015).



In our study, obesity was associated with adipocyte number and size. Therefore, the correlation between adipocyte size and TNF- $\alpha$  production was investigated to identify differences between visceral and subcutaneous adipocytes. There was a positive correlation between adipocyte size and the immunoexpression of TNF- $\alpha$  in visceral adipocytes, but not in subcutaneous adipocytes. Cao (2014) reported that adipocyte hypertrophy might favor the deregulation of the expression and secretion of adipokines. Moreover, cytokines may be involved in metabolic inflammation in humans, laboratory animals, and obese dogs (German et al., 2009, Ryan et al., 2010), and may induce apoptosis of preadipocytes and mature adipocytes, favoring the hypertrophy of the remaining adipocytes and the further secretion of adipokines (Goossens, 2008). Some studies suggest that adipocyte hypertrophy triggers hypoxia and cellular apoptosis, which stimulate the recruitment of macrophages (Goossens, 2008; Cao, 2014). Infiltrating macrophages acquire the M1 phenotype and secrete reactive oxygen species and more proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-6, which exacerbate the chronic inflammation associated with obesity (Lumeng et al., 2007; Finucane et al. 2014).

In the present study, leukocyte infiltration was observed in both the subcutaneous and visceral adipose tissues for only obese animals. Although the specific type of infiltrating leukocyte was not identified in the evaluated samples, it is possible that these leukocytes originate from macrophages because of the presence of mononuclear cells. However, further analysis is necessary to confirm this hypothesis.

Hotamisligil et al. (1993) observed the presence of a large number of macrophages in the adipose tissue of obese humans. It has now been recognized that increase in TNF- $\alpha$  production is due to the infiltration of M1 macrophages in the

adipose tissue, which corroborates the findings of this study, whereby the immunoexpression of TNF- $\alpha$  was positively correlated with leukocyte infiltration. Rafaj et al. (2017) suggests that macrophages that have infiltrated adipose tissue and accumulated during instances of hypoxia are the main source of cytokine production in obesity; as such, they play a fundamental role in inflammatory processes associated with obesity.

The limitations of the study included the collection of only one sample of subcutaneous and visceral adipose tissue, lack of analysis of cellular infiltration in adipose tissue, and lack of characterization of macrophage polarization.

Our results suggest that the metabolic changes associated with obesity in dogs may involve the production of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  stimulated by enlarged visceral adipocytes, as observed in humans.

#### **Conflicts of interest statement**

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

#### **Acknowledgement**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## References

- Cao, H., 2014. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J. Endocrinol.* 220, 147-159.
- German, A.J., Hervera, M., Hunter, L., Holden, S.L., Morris, P.J., Biourge, V., Trayhurn, P., 2009. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 37, 214-226.
- Goossens, G.H., 2008. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol. Behav.* 94, 206-218.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259, 87-91.
- Kabir, M., Stefanovski, D., Hsu, I.R., Iyer, M., Woolcott, O.O., Zheng, D., Katalano, K.J., Chiu, J.D., Kim, S.P., Harrison, L.N., Ionut, V., Lottati, M., Bergman, R.N., Richey, R.M., 2011. Large size cells in the visceral adipose depot predict insulin resistance in the canine model. *Obesity.* 19, 2121-2129.
- Kranendonk, M.E.G., Herwaarden, J.A.V., Stupkova, T., Jager, W., Vink, A., Moll, F.L., Kalkhoven, E., Visseren, F.L.J., 2015. Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depots relate differently to metabolic risk factors for cardiovascular disease: Distinct fat depots and vascular risk factors. *Atherosclerosis.* 239, 419-427.
- Laflamme, D.P., 1997. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Pract.* 22, 10-15.

- Lee, M-J., Wu, Y., Fried, S.K., 2012. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol. Aspects Med.* 34, 1-11.
- Mann, H.B., Whitney, D.R., 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics.* 18, 50-60.
- Mattioli, T.M.F., Noronha, L., Lima, A.A.S., Grégio, A.M.T., Machado, M.A.N., Azevedo, M.L.V., Martins, A.P.C., Azevedo-Alanis, L.R., 2011. Utilização de brocas trefina para a confecção de tissue microarray. *Arch. Oral Res.* 7, 161-167.
- Miller, R., Siegmund, D., 1982. Maximally selected Chi-square statistics. *Biometrics.* 38, 1101-1106.
- Rafaj, R.B., Kuleš, J., Marinculić, A., Tvarijonavičiute, A., Ceron, J., Mihaljević, Z., Tumpa, A., Mrljak, V., 2017. Plasma markers of inflammation and hemostatic and endothelial activity in naturally overweight and obese dogs. *BMC Vet Res.* 13, 1-7.
- Ryan, H.V., German, A.J., Wood, I.S., Hunter, L., Morris, P., Trayhurn, P., 2010. Adipokine expression and secretion by canine adipocytes: stimulation of inflammatory adipokine production by LPS and TNF- $\alpha$ . *Eur. J. Appl. Physiol.* 460, 603-616.
- Shuster, A., Patlas, M., Pinthus, J.H., Mourtzakis, M., 2012. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br. J. Radiol.* 85, 1-10.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., Hauner, H., 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1023-1033.
- Sperman, C. 1904. The Proof and Measurement of Association between Two Things. *Am. J. Psychol.* 15, 72-101.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821-1830.