

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A HIPERLEPTINEMIA E O**  
**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES OBESOS**

**Daniel José Hoffmann**  
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP  
2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A HIPERLEPTINEMIA E O**  
**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES OBESOS**

**Daniel José Hoffmann**

**Orientador: Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

ARAÇATUBA – SP

2017

Catálogo na Publicação(CIP)  
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

**DADOS**

Hoffmann, Daniel José

H699a

Associação entre a hiperleptinemia e o estresse oxidativo sistêmico em cães obesos / Daniel José Hoffmann.

Araçatuba: [s.n], 2017.

57f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2017

Orientador: Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini

1. Cães 2 . Obesidade. 3. Leptina. 4. Peroxidação de lipídeos.  
5. Antioxidantes. 6. Oxidantes I. T.

CDD 636.0896398



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

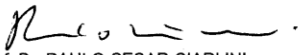
Câmpus de Araçatuba

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


TÍTULO: Associação entre a hiperleptinemia e o estresse oxidativo sistêmico em cães obesos

**AUTOR: DANIEL JOSÉ HOFFMANN**  
**ORIENTADOR: PAULO CESAR CIARLINI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. PAULO CESAR CIARLINI  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE  
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 07 de agosto de 2017.

## **CURRICULARES DO AUTOR**

**Daniel José Hoffmann** – Natural de Timbó, Santa Catarina, nascido em 25 de dezembro de 1987, filho de José Mateus Hoffmann e Marina Rodrigues da Silva, Médico Veterinário formado pela Universidade do Estado de Santa Catarina, Campus de Ciências Agroveterinárias – UDESC – CAV – Lages, SC no ano de 2012. Ingressou em 01 de janeiro de 2013 no Programa de Residência Médico-Veterinária na área de Diagnóstico Veterinário com ênfase em Patologia Clínica Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba – SP, tendo-o concluído em 31 de janeiro de 2015. Iniciou o curso de mestrado pelo programa de pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, campus de Araçatuba – SP, em 12 de fevereiro de 2015, sob orientação do Professor Adjunto Paulo César Ciarlini.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa  
ignorância.”

***(John F. Kennedy)***

## **DEDICATÓRIA**

À minha noiva, Flávia, por todo amor e companheirismo nesses anos que partilhamos juntos. Por todos os momentos de apoio durante as dificuldades impostas pela vida e por dividir comigo todas as alegrias ao decorrer destes anos. Por sempre me indicar o melhor caminho me ensinando a ser sempre melhor e nunca desistir de acreditar em mim. Todas as minhas conquistas recentes tiveram você como base! Te amo!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me presenteado com a vida e com pessoas tão especiais para dividir essa experiência.

Aos meus pais, José Mateus Hoffmann e Marina Rodrigues da Silva, que são responsáveis por tudo o que eu sou hoje. Sempre fazendo o possível e muitas vezes o impossível para criar e educar os filhos. É fato que esta tarefa não é fácil, entretanto olhando as minhas conquistas assim como as de meus irmãos é nítido que vocês desempenharam esta árdua tarefa com maestria.

Aos meus irmãos Rogério e Thales, que sempre se fizeram presentes de uma forma ou outra na minha formação, sempre juntos, tanto nas broncas quanto nas comemorações.

Ao meu afilhado Davi e ao meu sobrinho Tiago, que sempre esbanjam alegria sempre deixando o tio mais feliz.

A minha noiva Flávia, a qual sempre me apoiou e é minha base, meu motivo pra querer sempre mais, tenho orgulho de dizer que você é minha inspiração. Sem a sua força e companheirismo, presentes no dia a dia, me mantendo no caminho, me dando exemplos e conforto para nunca desacreditar, eu jamais teria conseguido chegar até aqui, e tenho certeza que este é só uma de muitas conquistas para nós dois.

Aos meus avós Albertino (*in memorian*), Helena (*in memorian*), Adelino (*in memorian*), e vó Gemma, que, embora por vezes distantes eu sempre soube que vocês estavam comigo, me apoiando, me mostrando o caminho certo e sempre que possível oferecendo aquele conforto que só casa de vó tem.

Ao meu orientador e amigo professor Paulo César Ciarlini, que sempre disposto a ensinar contribuiu numa escala sem medidas para a minha formação acadêmica.

Aos meus amigos de Bandeirantes – PR, Chico, Thais, João, Petrônio, Emilia, Léo e Gabi e todos aqueles que compartilharam da minha experiência nessa cidade tão acolhedora. Vocês foram nossa família nessa cidade, compartilhando de muitos momentos de confraternização e se mostraram verdadeiros amigos, por tudo



isso eu sou muito grato. Agradeço especialmente a Emilia que, com toda paciência, me auxiliou no desenvolvimento e interpretação das análises estatísticas do trabalho.

Aos meus amigos do CAV que foram minha segunda família, Kiki, Beto, Gui, Luiz, Caian, Gaivota, Olinto e tanto outros. Muito obrigado pela parceria, fico sempre na ansiedade para revê-los.

Aos amigos da UNESP Araçatuba e agregados, Arthur, Mari, Léo, Matheus, Xuxa, Acácio, Ju, Karina, Aline, Paraíba e Bruna. Vocês que sempre estiveram presentes na minha passagem por Araçatuba, muito obrigado pela amizade sincera e pelos incontáveis momentos de felicidade e alegria que passamos juntos nesse período.

Aos amigos do Laboratório Clínico Veterinário, Taiana, Ane, Dani, Luciana, Lilian e Margo por todo o apoio e trabalho em conjunto para que pudéssemos realizar este trabalho.

As minhas três “meninas”, Susi, Polly e Paçoca, que estão sempre comigo, sempre demonstrando esse amor incondicional de infinitas formas, tornando meu dia sempre mais feliz.

A todos que direta ou indiretamente tornaram a execução desse projeto possível, contribuindo das mais variadas formas, bem como aos animais utilizados e aos proprietários.

À FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa (Processo nº 2014/20662-0).

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado durante o primeiro ano do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade oferecida para a realização do curso de Mestrado.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>18</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>18</b>
<b>2. Obesidade Canina.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Leptina e obesidade .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Estresse Oxidativo.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Biomarcadores de estresse oxidativo .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.1 Concentração de oxidante totais .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.2 Peroxidação lipídica .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.3 Capacidade antioxidante total .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.4 Antioxidantes endógenos .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5 Índice de estresse oxidativo .....</b>	<b>28</b>
<b>4. Estresse oxidativo e obesidade .....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE A HIPERLEPTINEMIA E O ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES OBESOS. ....</b>	<b>39</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>41</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>43</b>
Delineamento experimental.....	43
Animais .....	43
Obtenções de amostras e análises laboratoriais .....	45
Análise estatística .....	46
<b>Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

DEXA – Absorciometria De Raios X De Dupla Energia

dL – Decilitro

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ECC – Escore de Condição Corporal

EDTA-Na – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético Dissódico

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EOS – Estresse Oxidativo Sistêmico

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FA – Fosfatase Alcalina

fL – Fentolitro

*g* – Força *g* (Gravitacional)

*g* – Grama

GGT – Gama Glutamil Transferase

HDL – Lipoproteínas de Alta Densidade

IEO – Índice de Estresse Oxidativo

L – Litro

LDL – Lipoproteínas De Baixa Densidade

LP – Leptina Plasmática

MDA – Malonaldeido

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mmol – Milimol

NADPH – Fosfato De Dinucleotídeo De Adenina E Nicotinamida

TAC – Capacidade Antioxidante Total

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tio-Barbitúrico

TNF- $\alpha$  – Fator De Necrose Tumoral  $\alpha$

TOC – Contração Oxidante Total

Trolox – Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UI – Unidades Internacionais

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{l}$  – Microlitro

$\mu\text{mol}$  – Micromol

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Caracterização dos cães de acordo com escore de condição corporal (ECC) de Laflamme (1997): Controle (ECC 4-5), sobrepeso (ECC 6-7) e obesos (ECC 8-9) .....**42**
- Tabela 2** - Perfil hematológico e bioquímico plasmático de cães de acordo com seu escore de condição corporal (ECC) de Laflamme (1997): Controle (ECC 4-5), sobrepeso (ECC 6-7) e obeso (ECC 8-9) .....**45**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Valores da concentração plasmática de leptina (A), TOC (B), Concentração de Ácido úrico (C) e IEO (D) de cães de acordo com seu escore de condição corporal (ECC): Controle (ECC 4-5), sobrepeso (ECC 6-7) e obeso (ECC 8-9), representados por mediana e intervalo de confiança. \*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (\*  $p < 0,05$  e  $1-\beta = 89,39\%$ ; \*\*  $p < 0,005$  e  $1-\beta = 95,41\%$ ; \*\*\* $p < 0,0484$  e  $1-\beta = 21,44\%$ ; \*\*\*\* $p < 0,0023$  e  $1-\beta = 72,41\%$ ). .....**48**

## **ASSOCIAÇÃO ENTRE A HIPERLEPTINEMIA E O ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES OBESOS**

**RESUMO** – A obesidade é um distúrbio nutricional frequente em cães, com prevalência de 30 a 50%, e representa um grande fator de risco para o desenvolvimento de uma série de doenças. A relação entre estresse oxidativo e obesidade em humanos é bem definida, entretanto em cães não está bem estabelecida. Foi realizada uma revisão bibliográfica sobre estresse oxidativo na obesidade canina, utilizando dois bancos de dados (Portal CAPES e PubMed), com fim de investigar a interferência do grau de obesidade no desenvolvimento do estresse oxidativo. Foi realizado um estudo observacional transversal com controle para confirmar a hipótese de que o grau de obesidade está correlacionado ao estresse oxidativo sistêmico. Para tal foram selecionados 121 cães, os quais foram distribuídos em grupos conforme o escore de condição corporal (ECC), controle (n=39), sobrepeso (n=38) e obeso (n=44). De todos os cães foram mensurados marcadores de obesidade (ECC e leptina) e marcadores de estresse oxidativo (Capacidade antioxidante total (TAC), Concentração oxidante total (TOC), Peroxidação lipídica (TBARS), Ácido úrico, Albumina, Gama Glutamil Transferase (GGT) e Índice de estresse oxidativo (IEO)). Os cães obesos apresentaram concentrações de leptina plasmática e indicadores de estresse oxidativo superiores aos demais grupos. Os valores intermediários de leptinemia e dos marcadores plasmáticos de estresse oxidativo sistêmico caracterizaram os cães com sobrepeso. Foi possível comprovar que a hiperleptinemia da obesidade está correlacionada com o estresse oxidativo sistêmico.

**Palavras chaves:** Obesidade, leptina, peroxidação de lipídeos, antioxidantes, oxidantes.

## **ASSOCIATION BETWEEN THE HIPERLEPTINEMIA AND THE SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS IN OBESE DOGS**

**SUMMARY** – Obesity is a common nutritional disorder in dogs, with prevalence of 30 to 50%, and represents a major risk factor for the development of a number of diseases. The relationship between oxidative stress and obesity in humans is well defined, however in dogs is not well established. A literature review was performed on oxidative stress in canine obesity, using two databases (Portal CAPES and PubMed), to investigate the interference of obesity degree in the development of oxidative stress. A cross-sectional study was carried out with control to confirm the hypothesis that the degree of obesity is correlated to the oxidative stress. For such 121 dogs were selected, which were distributed in groups according to body condition score (ECC), control (n = 39), overweight (n = 38) and obese (n = 44). All the dogs were measured obesity markers (ECC and leptin) and markers of oxidative stress (Total Antioxidant Capacity (TAC), Total Oxidant Concentration (TOC), lipid peroxidation (TBARS), uric Acid, albumin, Gamma Glutamyl Transferase (GGT) and Oxidative Stress Index (IEO)). Obese dogs showed plasma leptin concentrations and oxidative stress indicators higher than the other groups. The intermediary values of leptin and the systemic oxidative stress plasmatic markers characterized the overweight dogs. It was possible to prove that obesity hyperleptinemia is correlated with systemic oxidative stress.

**Keywords:** Obesity, leptin, lipid peroxidation, antioxidant, oxidants



# Capítulo 1

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. Introdução

A obesidade canina é uma doença caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo, tendo etiologia multifatorial (BURKHOLDER; TOLL, 2000).

Devido a maior proximidade dos animais de companhia com seus tutores e consequente aquisição de hábitos alimentares humanos (VEIGA, 2008) a obesidade canina vem, a espelho do que ocorre em humanos, se tornando uma doença cada vez mais comum, com prevalência de até 50% (BLAND; HILL, 2009; APTEKMANN, 2014). Tal distúrbio, em humanos, muitas vezes apresenta-se com ocorrência maior que a dos casos de desnutrição (KOPELMAN, 2000).

Uma das características mais importantes da obesidade é a sua correlação com o desenvolvimento de diversas enfermidades como *diabetes mellitus*, insulinoma, doenças articulares, cardiopatias, entre outras. A relação dessas comorbidades com a obesidade ainda não é bem definida, entretanto existe um consenso de que o estresse oxidativo, desencadeado pelo acúmulo de gordura visceral, esteja correlacionado com o desenvolvimento de tais processos patológicos (MANNA; JAIN, 2015).

É fundamental conhecer melhor a relação entre o estresse oxidativo sistêmico e o grau de adiposidade visando contribuir com novas estratégias na prevenção das doenças sistêmicas associadas a obesidade canina.

## 2. Obesidade Canina

Obesidade é caracterizada por um acúmulo de tecido adiposo maior que 15% do peso corporal do cão (BURKHOLDER; TOLL, 2000; JEUSETTE et al., 2010), sendo um distúrbio nutricional muito comum na espécie e um grande fator de risco para uma série de doenças como *diabetes mellitus*, hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo, insulinooma, doenças respiratórias, hepatopatias, hiperlipidemia, doenças articulares, cardiopatias e pancreatite (BURKHOLDER; TOLL, 2000; GERMAN, 2006; MENTZEL et al., 2006; THENGCHRAISRI et al., 2014; BACH et al., 2007).

A obesidade canina é uma doença multifatorial, tendo como principais fatores predisponentes a raça, sexo, idade, fatores genéticos, baixo nível de atividade física e gonadectomia (BLAND; HILL, 2009; GERMAN, 2006). Embora estes fatores contribuam para o desenvolvimento da obesidade, os principais fatores são os de caráter nutricional como a alta densidade energética alimentar, quantidade de alimento fornecido, número de refeições, fornecimento de petiscos e sobras de mesa somados a um baixo gasto energético do animal (GERMAN, 2006). A obesidade também pode estar associada a distúrbios endócrinos, tais como, hipotireoidismo e hiperadrenocorticismo, porém esses distúrbios endócrinos respondem apenas por 5% da população obesa em cães e gatos (BORGES; NUNES, 1998; MORGANTE, 1999).

Tal distúrbio tem se tornado cada vez mais frequente na população mundial e provavelmente sua ocorrência será maior do que as dos casos de desnutrição e doenças infecciosas resultando em uma contribuição significativa para problemas de saúde em humanos (KOPELMAN, 2000). Com a domesticação dos animais de companhia e a convivência direta com seus proprietários houve a aquisição de hábitos humanos pela espécie, principalmente no que diz respeito à alimentação. Atualmente os caninos habitam o interior de casas ou apartamentos, com pouco acesso ao exterior e ingerem uma dieta rica em carboidratos (VEIGA, 2008). Aproximadamente 97%

dos casos de obesidade canina estão correlacionados aos hábitos de sedentarismo do proprietário (BLAND; HILL, 2009).

Segundo Bland e Hill (2012), a obesidade canina foi identificada como uma das doenças nutricionais mais comuns com prevalência de 30 a 50%. Estima-se que cerca de 34,1% da população canina americana encontra-se em sobrepeso ou obesa (LUND et al., 2006). Na Austrália a prevalência de obesidade canina é 41% (McGREEVY et al., 2005) e apenas 25% dos proprietários acreditam que seus cães estão com sobrepeso (ROBERTSON, 2003). Na população canina brasileira, apesar da prevalência de cães com sobrepeso (48%) e obesos (52%) ser alta, somente 27% dos proprietários acreditam que os seus animais apresentem tais alterações (APTEKMANN, 2014).

Existem vários métodos de avaliação da composição e condição corporal, como a absorciometria de raios X de dupla energia (DEXA), tomografia computadorizada, ressonância magnética, análise por ativação de nêutrons, bioimpedância, ultrassonografia, hidrodensitometria, índices de massa corporal e antropometria. Alguns destes, que são de custo mais baixo, já estão sendo utilizados na rotina clínica da medicina veterinária (HEYWARD, 2001).

Diversos métodos de diagnóstico de obesidade utilizados em humanos não são aplicáveis em cães, por exemplo, o índice de massa corporal, que é um indicador amplamente utilizado e relativamente simples em humanos, mas em cães não se aplica devido à variabilidade dos parâmetros morfométricos entre raças (ISHIOKA et al., 2007).

O escore de condição corporal (ECC) é considerado um dos métodos mais práticos para a identificação clínica da obesidade (LAFLAMME, 2006), sendo um parâmetro muito utilizado para avaliar a condição corporal em cães e é baseado na inspeção e palpação do paciente, empregando escalas numéricas, podendo apresentar variações de escalas (com cinco ou nove classificações) (Figura 1.). Este método tem se mostrado bastante útil na avaliação da condição corporal, devido a sua simplicidade, porém é um teste subjetivo e estimativo (LAFLAMME, 1997).

Um indicador mais representativo do grau de adiposidade corpórea é a leptina plasmática, uma adipocina primariamente secretada por adipócitos, com papel regulatório do balanço energético, tendo correlação direta com a quantidade de gordura corporal sem apresentar interferências de fatores como gênero, idade e raça (ISHIOKA et al., 2007). Sua concentração plasmática é decrescida quando instituído uma dieta de redução de peso (JEUSETTE et al., 2005).

As alterações bioquímicas decorrentes da obesidade, com o acúmulo de gordura visceral, incluem modificações no metabolismo de lipoproteínas e carboidratos, um critério bem estabelecido para o diagnóstico de síndrome metabólica em humanos, a qual é caracterizada por diversos fatores de risco cardiovascular, incluindo dislipidemia aterogênica, tolerância anormal à glicose, hipertensão e obesidade visceral, condições que estão intimamente associadas com resistência à insulina e correlacionadas ao desenvolvimento de doença cardiovascular e de *diabetes mellitus* tipo 2 (FERREIRA et al., 2011a).

Sabe-se que cerca de 20% dos animais obesos apresentam distúrbios metabólicos similares aos encontrados em humanos com síndrome metabólica (TVARIJONAVICIUTE et al., 2012), porém em animais de companhia esse critério ainda não foi bem estabelecido. Em animais obesos ocorre aumento significativo de glicose, nitrogênio ureico sanguíneo, colesterol total, triglicérides, lipoprotinas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), atividade de gama glutamiltransferase (GGT) (TRIBUDDHARATANA et al., 2011), resistência insulínica, dislipidemia e moderada hipertensão (TVARIJONAVICIUTE et al., 2016).

Em humanos, porém não em cães, têm sido hipotetizado (FURUKAWA et al., 2004) que apenas o acúmulo de gordura corporal, independente do desenvolvimento de hiperglicemia e hipertrigliceridemia, pode levar ao estresse oxidativo sistêmico e tecidual. Pelo menos em partes, este estresse está associado à produção desregulada de adipocinas e ao desenvolvimento da síndrome metabólica (FURUKAWA et al., 2004).

## 2.1 Leptina e obesidade

A leptina foi a primeira das adipocinas tradicionais a serem identificadas, sendo correlacionada com a supressão do apetite e aumento do gasto energético via termogênese (ZORAN, 2010). Sua concentração é proporcional ao tecido adiposo e diminui durante o jejum, provocando um aumento do apetite por meio da ativação reduzida de receptores no centro de saciedade hipotalâmica, uma diminuição na taxa metabólica global, maior regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, baixa regulação dos eixos hipotálamo-hipófise-tireóide e hipotálamo-hipófise-eixos gonadais. Essas mudanças são revertidas quando o consumo de alimentos é retomado e a concentração de leptina aumenta. Assim, em circunstâncias fisiológicas normais a leptina atua para manter a homeostase de energia durante o jejum e realimentação. Além do que a estrutura da leptina é semelhante à da IL-6, fazendo com que ela apresente atividade pró-inflamatória (CLARK; HOENIG, 2016).

A atuação da leptina no hipotálamo resulta em uma série de eventos que levam a supressão do apetite, incluindo o estímulo de neurônios anorexigênicos via neurotransmissores como o hormônio estimulador de melanócitos (MSH) e hormônio transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) (ZORAN, 2010). Na obesidade humana e em animais de companhia o problema não se dá pela falta de leptina e sim pela resposta diminuída à leptina no hipotálamo (MARTIN et al., 2008). Segundo Zoran (2010), essa falha no *feedback* da leptina é multifatorial e pode ser dada em partes pela saturação dos sistemas de transporte na barreira hematoencefálica, levando a uma resistência a leptina plasmática, alteração da sinalização de leptina neuronal em neurônios alvos ou alterada sinalização em células alvo e neurocircuitos. Expressões aumentadas de proteínas que bloqueiam a sinalização da leptina incluem a proteína-tirosina fosfatase 1B e supressor da sinalização de citocina, acarretando em uma resistência neuronal à leptina (LEAL, 2013).

O acúmulo de gordura corporal leva a uma diminuição da perfusão tecidual que culmina na produção de adipocinas pró-inflamatórias, diminuindo a produção de adiponectina e acentuando a expressão de leptina, fator inibitório de macrófago, fator de crescimento vascular endotelial e ativador da inibição do plasminogênio (ENGIN, 2017).

A adiponectina é uma importante adipocina produzida pelos adipócitos, que tem como uma das principais funções o aumento da sensibilidade celular à insulina, prevenção do acúmulo de lipídeos na musculatura esquelética e no fígado, estimulação da oxidação de ácidos graxos e ainda apresenta características anti-inflamatória (FRUHBECK et al., 2017).

Existem dois mecanismos principais para a predisposição à doenças pelo acúmulo de gordura corporal: a deposição excessiva de gordura pode ter efeitos físicos e mecânicos que predispõem à doenças ortopédicas, obstruem vias respiratórias, diminuem a higiene e dissipação de calor; e a alteração da função endócrina normal do tecido adiposo, a qual pode levar a diversas condições associadas a obesidade (GERMAN, 2010).

Em animais de companhia é sabido que o aumento da adiposidade tem relação com o aumento de adipocinas como a leptina (SAGAWA et al., 2002) e redução da adiponectina plasmática (ISHIOKA et al., 2002). Dietas que promovam perda de peso resultam na diminuição da concentração plasmática da leptina (JEUSETTE et al., 2005).

Uma das alterações endócrinas encontradas em cães obesos decorrente da hiperleptinemia é a resistência a insulina relacionada a expressão aumentada da proteína supressora da sinalização de citocina. A leptina melhora a ação da insulina na inibição da produção de glicose pelo fígado e melhora a absorção celular de glicose, evidenciando o papel da leptina na regulação da sensibilidade à glicose (GERMAN, 2010).

A hiperleptinemia também está associada ao estado subinflamatório crônico da obesidade, estando correlacionada com a ativação de macrófagos, aumento da concentração de TNF- $\alpha$ , produção de espécies reativas de oxigênio, elevada expressão de óxido-nítrico sintase, expressão de proteínas

químioatraentes de monócitos, proliferação e migração de células endoteliais (GERMAN, 2010; LEAL, 2013).

### 3. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o dano tecidual resultante de um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidantes (BARBOSA et al., 2010). A geração de compostos oxidativos é fisiologicamente importante como parte de um mecanismo de defesa contra microorganismos invasores ou células malignas, bem como de reparação tecidual, cicatrização e remodelação (CHEUNG et al., 2000).

As principais espécies reativas de oxigênio distribuem-se em dois grupos, os radiculares: hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ) e alcóxila ( $\text{RO}\cdot$ ); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (SAVINI et al., 2013).

A mensuração direta de ERO são bastante complexas e onerosas. Técnicas simples de mensuração de biomarcadores ou produtos finais de processos oxidativos mediados por ERO são utilizadas com frequência para estimar o estresse oxidativo. A avaliação da peroxidação lipídica, como a mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), é amplamente utilizada como indicador de danos causados pelo estresse oxidativo. Lipídios e proteínas oxidados podem ser citotóxicos e levar a danos na membrana celular e nos receptores de membrana, alterações na permeabilidade seletiva de membrana, disfunção enzimática e interrupção da sinalização de cascatas, além de ativar processos inflamatórios. A consequência mais séria da oxidação desses lipídios e proteínas são as alterações na permeabilidade de membrana, os danos ao DNA e morte celular (VINCENT et al., 2007).



### **3.1 Biomarcadores de estresse oxidativo**

#### **3.1.1 Concentração de oxidante totais**

A análise individual das diferentes moléculas oxidantes não é prática e há de se considerar que o efeito de cada desses oxidantes são aditivos. A concentração de oxidantes totais de uma amostra pode ser mensurada e é comumente nomeada de peroxidação total, atividade sérica de oxidação, metabólitos da reação de oxigênio ou outros sinônimos. Embora vários desses métodos tenham sido desenvolvidos nenhum deles é considerado ideal por terem grandes problemas analíticos e restrições técnicas (EREL, 2005).

Uma técnica mais rápida, estável, confiável, sensível, barata e totalmente automatizada é a técnica de mensuração da concentração de oxidantes totais pelo método de *xylenol orange*, a qual é baseada na oxidação do íon ferroso em íon férrico na presença de diversas espécies oxidantes em meio ácido, tendo como principais componentes o peróxido de hidrogênio e o hidroperóxido lipídico (EREL, 2005).

#### **3.1.2 Peroxidação lipídica**

Um dos principais alvos das espécies reativas de oxigênio são os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, causando uma peroxidação lipídica e consequente dano à estrutura e função celular. Existem dados que indicam que o estresse oxidativo em humanos com hipertensão podem levar a danos celulares nas paredes de vasos sanguíneos os quais estariam correlacionados ao desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares (KONUKOGLU et al., 2005)

A mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é um indicador indireto da peroxidação lipídica sofrida pela membrana celular, o qual

se baseia em quantificar a concentração de malonaldeído (MDA), um dos principais produtos deste processo (HODGES et al., 1999, ESTERBAUER et al., 1993).

### **3.1.3 Capacidade antioxidante total**

O organismo possui proteções contra as ERO, como as macromoléculas que configuram a proteção enzimática (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e micromoléculas (glutathione, carotenóides, bilirrubina, ubiquinona, ácido úrico e tocofenóis e ácido ascórbico) que podem ter origem no próprio organismo ou serem adquiridas através da dieta (BARREIROS; DAVID, 2006).

Assim como as moléculas oxidantes, os antioxidantes podem ser mensurados separadamente, entretanto as diversas análises levam tempo e requerem técnicas complexas. Ainda, os efeitos dos antioxidantes são aditivos, sendo que a mensuração de apenas alguns marcadores não levam a uma análise confiável da capacidade antioxidante de um organismo. Tendo em vista estes fatores supracitados se faz necessária a utilização de técnicas que demonstrem a capacidade antioxidante total (EREL, 2004).

### **3.1.4 Antioxidantes endógenos**

Entre os principais antioxidantes encontrados no plasma humano estão proteínas/peptídeos com grupamento tiol, como a albumina; os antioxidantes solúveis em água como o ácido úrico e o ácido ascórbico, além dos antioxidantes solúveis em gordura como os carotenóides e tocoferol (YEUM et al., 2004).

A albumina é uma proteína plasmática que apresenta diversas funções fisiológicas e farmacológicas, transportando metais, ácidos graxos, colesterol, pigmentos biliares e drogas, além de ser um elemento chave na regulação da

pressão osmótica e distribuição dos fluidos entre diferentes compartimentos. Uma grande porção da capacidade antioxidante total pode ser atribuída a albumina. Essa proteção antioxidante se dá pela propriedade de ligação da albumina a diversas substâncias como ions metálicos de cobre e ferro, os quais quando livres, podem reagir com o peróxido de hidrogênio formando radicais hidroxil, que são potentes ERO (ROCHE et al., 2008)

O ácido úrico é um antioxidante tão efetivo quanto a Vitamina C, e por ter concentrações séricas normais muito superiores a outros antioxidantes é considerado um dos mais importantes antioxidantes em humanos. Em concentrações fisiológicas o ácido úrico reduz o oxidante oxo-heme formado pela reação de peroxidação da hemoglobina, protegendo os eritrócitos contra a peroxidação lipídica e seus danos, que podem levar a eritrólise (AMES et al., 1981).

A enzima gama glutamil transferase (GGT) está associada a um papel importante no sistema de defesa antioxidante e tem sido correlacionada com a obesidade em humanos (CHOI, 2003), porém não em cães. O principal papel da GGT é metabolizar a glutathione reduzida extracelular, permitindo que o aminoácido precursor ser assimilado e reutilizado para a síntese da glutathione (LEE et al., 2004), a qual é considerada um dos principais antioxidantes enzimáticos (HALIWELL, 1994; BARBOSA et al., 2010; VINCENT; TAYLOR, 2006). Em cães a GGT é considerada uma marcadora das desordens hepatobiliares, apesar de sua maior concentração no tecido renal e pancreático. Sua importância clínica está ligada no diagnóstico da colestase e de lesões hepáticas de caráter inflamatórias e tóxicas (VIDAL et al., 2009)

Em cães a mensuração de GGT como biomarcador de estresse oxidativo é bastante controversa, e tem sido associada ao depósito de gordura hepática (TRIBUDDHARATANA et al., 2011).

A bilirrubina total é um produto do catabolismo do grupo heme em mamíferos, embora seja considerada um resíduo que necessite ser excretado, possui importante função antioxidante, pois é um varredor de ERO. Em situações com concentrações de oxigênio menores que 2%, a bilirrubina inibe a oxidação

celular melhor que os tocofenóis que são tidos como os melhores antioxidantes frente a peroxidação lipídica (STOCKER, 1987).

### 3.1.5 Índice de estresse oxidativo

Vários estudos sugerem que a TAC e a TOC são parâmetros úteis na avaliação de um quadro de estresse oxidativo relacionado a diversas patologias. Entretanto a razão entre os dois indicadores se mostra muito mais sensível para detectar o estresse oxidativo sistêmico (PIRGON et al., 2013; AYCICEK et al., 2005).

O índice de estresse oxidativo (IEO) é uma relação entre a concentração de oxidantes totais dividido pela capacidade antioxidante total, sendo calculado como segue:  $IEO = \frac{TOC \text{ equivalente } \mu\text{mol de peróxido de hidrogênio/L}}{TAC \text{ equivalente } \mu\text{mol de trolox/L}} \times 100$  (AYCICEK et al., 2005).

## 4. Estresse oxidativo e obesidade

A obesidade tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de inúmeras enfermidades crônicas não transmissíveis com potencial carcinogênico, neurodegenerativo e cardiovasculares (BARBOSA et al., 2010). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das patologias relacionadas à obesidade canina ainda não são bem compreendidos, contudo há um consenso de que o estresse oxidativo tem um importante papel no desenvolvimento destes processos (BLAND; HILL, 2012; GERMAN, 2006; THENGCHAI SRI et al., 2014; BACH et al., 2007). A relação entre estresse oxidativo e obesidade em animais de laboratório (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008, TVARIJONAVICIUTE et al., 2016) e cães (FERREIRA et al., 2011) tem sido cada vez mais investigada nos últimos anos

Sabe-se que níveis elevados de glicose e lipídios circulantes podem resultar em um suprimento excessivo de substratos de energia para as vias metabólicas em células adiposas e não adiposas, o que por sua vez pode aumentar a produção de ERO, levando a resistência insulínica e acúmulo de gordura abdominal desencadeando elevações significativas nas concentrações de TNF $\alpha$  e ácidos graxos livres. (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008). Este estresse oxidativo induzido por hiperglicemia pode contribuir para a patogenia de complicações do *diabetes mellitus* (SUZUKI, 1999)

O decréscimo na concentração plasmática de alguns antioxidantes foi relato em cães obesos que desenvolveram síndrome de disfunção metabólica relacionada à obesidade, sugerindo uma relação entre esta condição e o desenvolvimento de estresse oxidativo sistêmico (TVARIJONAVICIUTE et al., 2016). Há uma correlação inversa entre adiponectina plasmática e as substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em ratos obesos (FURUKAWA et al. (2004). Tem sido postulado (ISHIOKA et al., 2007) que o acúmulo de gordura corporal por si só pode aumentar o estresse oxidativo sistêmico independente da presença de hiperglicemia. A leptina é uma adipocitocina sintetizada e secretada pelo tecido adiposo, encontrada em altas concentrações nos cães obesos (JEUSETTE et al., 2005). Em humanos (MANGGE et al., 2017), porém não em cães, o aumento do estresse oxidativo na obesidade tem sido associada à produção desregulada de leptina plasmática.

Tratamentos com inibidores de NADPH oxidase diminuíram a produção de ERO no tecido adiposo de ratos obesos, atenuando os efeitos da produção desregulada de adipocinas, levando a uma diminuição das lesões teciduais causadas pelo EOS no desenvolvimento da síndrome metabólica (FURUWAKA et al., 2004).

Fica evidente a necessidade de correlacionar o grau de obesidade com o desenvolvimento do estresse oxidativo sistêmico em cães. Sendo a leptina um bom marcador de adiposidade e tendo esta adipocina uma ação pró-inflamatória, torna-se importante também estabelecer a sua associação com o estresse oxidativo sistêmico de cães obesos.

## REFERÊNCIAS

AMES, B N. et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 11, p. 6858-6862, 1981.

APTEKMANN, K. et al. Aspectos nutricionais e ambientais da obesidade canina. **Ciência Rural**, p. 2039-2044, 2014.

AYCICEK, A.; EREL, O; KOCYIGIT, A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. **Pediatrics International**, v. 47, n. 6, p. 635-639, 2005.

BACH, J. F. et al. Association of expiratory airway dysfunction with marked obesity in healthy adult dogs. **American journal of veterinary research**, v. 68, n. 6, p. 670-675, 2007.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. de L.. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. 2006.

BLAND, I. M. Dog obesity keeping the weight off. **The veterinary journal**, v. 192, p. 3, 2012.

BLAND, I.; HILL, J. Tackling dog obesity by tackling owner attitudes. **Animal Science Reviews**, p. 11, 2012.

BORGES, F.M. DE O.; NUNES, I. J. Nutrição e manejo alimentar de cães na saúde e na doença. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, n. 23, p. 5 -103, 1998.

BURKHOLDER, W.J.; TOLL, P.W. Obesity. In: HAND, M.S.et al. **Small animal of clinical nutrition**. 4.ed. Kansas: MarkMorres Institute, 2000. p.401-430.

CHEUNG, A. K. et al. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. **Kidney international**, v. 58, n. 1, p. 353-362, 2000.

CHOI, J. W. Association between elevated serum hepatic enzyme activity and total body fat in obese humans. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 33, n. 3, p. 257-264, 2003.

CLARK, M.; HOENIG, M. Metabolic effects of obesity and its interaction with endocrine diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 5, p. 797-815, 2016.

ENGIN, A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. In: **Obesity and Lipotoxicity**. Springer International Publishing, 2017. p. 221-245.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103-1111, 2005.

FERREIRA, L. T. et al. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 3, 2011.

FERREIRA, A. L. A. et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 1, p. 54-61, 2011b.

FRÜHBECK, G. et al. Normalization of adiponectin concentrations by leptin replacement in ob/ob mice is accompanied by reductions in systemic oxidative stress and inflammation. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752, 2004.

GERMAN, A. J. et al. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 4-9, 2010.

GERMAN, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1940S-1946S, 2006.

HALLIWELL, B.. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HEYWARD, V.. ASEP methods recommendation: body composition assessment. **Journal of Exercise Physiology online**, v. 4, n. 4, 2001.

ISHIOKA, K. et al. Experimental and clinical studies on plasma leptin in obese dogs. **Journal of veterinary medical science**, v. 64, n. 4, p. 349-353, 2002.



ISHIOKA, K. et al. Plasma leptin concentration in dogs: effects of body condition score, age, gender and breeds. **Research in veterinary science**, v. 82, n. 1, p. 11-15, 2007.

JEUSETTE, I. C. et al. Effect of breed on body composition and comparison between various methods to estimate body composition in dogs. **Research in veterinary science**, v. 88, n. 2, p. 227-232, 2010.

JEUSETTE, I. C. et al. Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 66, n. 1, p. 81-86, 2005.

KONUKOGLU, D.; SERIN, O.; TURHAN, M. S.. Plasma leptin and its relationship with lipid peroxidation and nitric oxide in obese female patients with or without hypertension. **Archives of medical research**, v. 37, n. 5, p. 602-606, 2006.

KOPELMAN P. Obesity as a medical problem. **Nature** 2000;404:635-43.

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

LAFLAMME, D. P. Understanding and managing obesity in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 36, n. 6, p. 1283-1295, 2006.

LEAL, V. de o.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 419, p. 87-94, 2013.

LEE, D.; BLOMHOFF, R.; JACOBS, D. R. Review is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress?. **Free radical research**, v. 38, n. 6, p. 535-539, 2004.

LUND, E. M. et al. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2, p. 177, 2006.

MANNA P., JAIN S. K. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015;13:423–44.

MANGGE, H. et al. Influence of Antioxidants on Leptin Metabolism and its Role in the Pathogenesis of Obesity. In: **Obesity and Lipotoxicity**. Springer International Publishing, 2017. p. 399-413.

MARTIN, S. S.; QASIM, A.; REILLY, M. P. Leptin resistance. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 15, p. 1201-1210, 2008.

MATSUZAWA-NAGATA, N. et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet–induced insulin resistance and obesity. **Metabolism**, v. 57, n. 8, p. 1071-1077, 2008.

MCGREEVY, P. D. et al. Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. **Veterinary Record-English Edition**, v. 156, n. 22, p. 695-701, 2005.

MENTZEL, R. E. et al. Obesidade no cão e no gato: abordagem comportamental. **Paris: Royal Canin**, 2006.

MORGANTE, M. Obesità negli animali da compagnia: problema emergente. **Praxis Veterinaria**, v. 20, n. 2, p.18-22, 1999.

PIRGON, Ö. et al. Association between insulin resistance and oxidative stress parameters in obese adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of clinical research in pediatric endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 33, 2013.

ROBERTSON, I. D. The association of exercise, diet and other factors with owner-perceived obesity in privately owned dogs from metropolitan Perth, WA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, n. 1, p. 75-83, 2003.

ROCHE, M. et al. The antioxidant properties of serum albumin. **FEBS letters**, v. 582, n. 13, p. 1783-1787, 2008.

SAGAWA, M. M. et al. Correlation between plasma leptin concentration and body fat content in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 63, n. 1, p. 7-10, 2002.

SAVINI, I. et al. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, 2013.

STOCKER, R. et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. **Science**, v. 235, p. 1043-1047, 1987.

SUZUKI, S. et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. **Diabetes research and clinical practice**, v. 45, n. 2, p. 161-168, 1999.

THENGCHAI SRI, N. et al. Abdominal obesity is associated with heart disease in dogs. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 131, 2014.

TRIBUDDHARATANA, T. et al. Biochemical alterations and their relationships with the metabolic syndrome components in canine obesity. **Kasetsart J.(Nat. Sci.)**, v. 45, p. 622-628, 2011.

TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Obesity-related metabolic dysfunction in dogs: a comparison with human metabolic syndrome. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 147, 2012.

TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Obese dogs with and without obesity-related metabolic dysfunction—a proteomic approach. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 211, 2016.

VEIGA, A. P.M. et al. Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 2, p. 224-228, 2008.

VIDAL, I. F. et al. Níveis séricos da gama-glutamyltransferase em cães com e sem infecção natural por Leishmania (Leishmania) chagasi. **Arq. bras. med. vet. zootec**, p. 749-751, 2009.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International journal of obesity**, v. 30, n. 3, p. 400-418, 2006.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007.

ZORAN, D. L. Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 40, n. 2, p. 221-239, 2010.

YEUM, K. et al. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 430, n. 1, p. 97-103, 2004.

## Capítulo 2

## **CAPÍTULO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE A HIPERLEPTINEMIA E O ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES OBESOS.**

Daniel J. Hoffmann<sup>1</sup>, Taiana C. Valadares<sup>1</sup>, Anelise M. Bosco<sup>1</sup>, Lillian Baptostoplli<sup>1</sup>, Paulo C. Ciarlini<sup>1</sup>

**RESUMO:** A obesidade é o principal distúrbio nutricional em cães. O aumento da adiposidade tem relação direta com o aumento de leptina plasmática (LP). A hiperleptinemia tem sido associada ao estresse oxidativo em humanos, porém esta relação não foi investigada em cães obesos. Nós investigamos a hipótese de que a hiperleptinemia está correlacionada com o estresse oxidativo sistêmico em cães com sobrepeso e obesos. Para tal foram selecionados 121 cães conforme o escore de condição corporal (ECC), um grupo controle constituído de 39 animais com ECC considerado ideal (ECC 4 e 5) foi comparado a 38 cães com sobrepeso (ECC 6 e 7) e 44 cães obesos (ECC 8 e 9). De todos os cães foram mensurados o grau de obesidade (ECC e LP) e o estresse oxidativo plasmático (capacidade antioxidante total, concentração oxidante total (TOC), Índice de estresse oxidativo (IEO), peroxidação lipídica plasmática, além dos antioxidantes endógenos, ácido úrico, albumina e atividade de GGT). O estresse oxidativo sistêmico em cães obesos, porém não naqueles com sobrepeso, foi caracterizado por um maior IEO e TOC. O IEO teve correlação direta com ECC e TOC. O ácido úrico em cães obesos teve correlação direta com ECC e LP. Em cães obesos a LP foi maior que os demais grupos e teve correlação direta com o ECC e IEO. Esta é uma das primeiras evidências de que o estresse oxidativo sistêmico está diretamente correlacionado com a hiperleptinemia da obesidade canina.

**Palavras chaves:** Obesidade, leptina, peroxidação de lipídeos, antioxidantes, índice de estresse oxidativo.

## **ASSOCIATION BETWEEN THE HIPERLEPTINEMIA AND THE SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS IN OBESE DOGS**

**SUMMARY** – The obesity is the main nutritional disorder in dogs. The increase in fatness is directly related to increased plasma leptin (LP). The hyperleptinemia has been associated with the oxidative stress in humans, but this relation has not yet been investigated in obese dogs. We investigated the hypothesis that hiperleptinemia is correlated with the increase of systemic oxidative stress with overweight and obese dogs. For such 121 dogs were selected as the body condition score (ECC), a control group consisting of 39 animals with ECC considered ideal (ECC 4 and 5) was compared to 38 dogs with overweight (ECC 6 and 7) and 44 obese dogs (ECC 8 and 9). All the dogs were measured for the degree of obesity (ECC and LP) and oxidative stress in plasma (total antioxidant capacity, total oxidant concentration (TOC), oxidative stress index (IEO), plasmatic lipid peroxidation, in addition to endogen antioxidants, uric acid, albumin, and Gama Glutamyl Transferase activity (GGT). The systemic oxidative stress in obese dogs, but not in overweight, has been confirmed by the increase of the IEO and IEO. The IEO had direct correlation with TOC and ECC. The obese dogs LP was bigger than the other groups, being observed a direct correlation between this adipocin, ECC and IEO. The uric acid in obese dogs had a direct correlation with ECC and LP. This is one of the firsts evidences that systemic oxidative stress is directly correlated with the hiperleptinemia of canine obesity.

**Keywords:** Obesity, leptin, lipid peroxidation, antioxidant, oxidative stress index



## Introdução

A obesidade canina é caracterizada por um acúmulo de tecido adiposo que excede 15% do peso ideal do animal (BURKHOLDER; TOLL, 2000, JEUSETTE et al., 2010). No cão a obesidade é multifatorial (BLAND; HILL, 2012), sendo que na maioria dos casos associada à alta ingestão de calorias e pouco gasto energético (GERMAN, 2006; ZORAN, 2010). É o distúrbio nutricional mais comum em cães com prevalência de 30 a 50% (BLAND; HILL, 2012; APTEKMAN, 2014) e um grande fator de risco para uma série de doenças como diabetes mellitus, hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo, insulinoma, doenças pulmonares, hepatopatias, hiperlipidemia, doenças articulares, cardiopatias, pancreatite, entre outras (BLAND; HILL, 2012; GERMAN, 2006; THENGCHAI SRI et al., 2016; BACH et al., 2007). Cerca de 20% dos animais obesos apresentam distúrbios metabólicos similares aos encontrados em humanos com síndrome metabólica (TVARIJONAVICIUTE et al., 2012).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das doenças na obesidade ainda não são bem compreendidos, porém há amplo consenso de que o estresse oxidativo tem um papel importante nos processos degenerativos (BLAND; HILL, 2011; GERMAN, 2006; THENGCHAI SRI et al., 2016; BACH et al., 2007). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes do organismo, cuja produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (ERO) consome as defesas antioxidantes orgânicas, causando maior oxidação dos componentes celulares e teciduais, promovendo peroxidação lipídica, alterações na permeabilidade de membrana e danos ao DNA em diversos tecidos (ZAMZAMI et al., 1996).

As informações sobre o estresse oxidativo e a obesidade em cães são escassas (FERREIRA et al., 2011; MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008; TVARIJONAVICIUTE, 2016). Sabe-se que o suprimento excessivo de substratos de energia contribui para um aumento dos adipócitos e consequente maior produção de ERO (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008). Por esta razão o tecido

adiposo é considerado como um órgão endócrino e pró-inflamatório (RUTKOWSKI et al., 2006). Tem sido proposto que as adipocinas ou adipocitocinas produzidas pelo adipócito comprometem a função de órgãos centrais (TILG; MOSCHEN 2010). Na obesidade humana grave, estima-se que comparado ao fígado, o tecido adiposo produz de 100 a 1000 vezes mais citocinas pró-inflamatórias que afetam muitos órgãos, incluindo os vasos do fígado, pâncreas, coração e sangue (MOSCHEN et al., 2011).

A leptina é uma adipocina proteica pró-inflamatória sintetizada e segregada principalmente por adipócitos, cuja concentração plasmática está correlacionada positivamente ao peso corporal e os parâmetros morfométricos de cães (JEUSETTE et al., 2005). A concentração de leptina é maior em obesos, sendo considerada um bom índice de adiposidade em cães independentemente de gênero, idade e raça (ISHIOKA et al., 2007). O emagrecimento sabidamente promove uma diminuição da leptina plasmática (JEUSETTE et al., 2005). Em humanos tem sido hipotetizado de que o acúmulo de gordura corporal por si só pode aumentar o estresse oxidativo sistêmico independente da presença de hiperglicemia (FURUKAWA et al., 2004) e que o aumento do estresse oxidativo na obesidade pode estar relacionado à produção desregulada de adipocitocinas como a leptina (FURUKAWA et al., 2004; SAGAWA et al., 2002).

Deve-se ressaltar que a LP tem papel importante no centro da saciedade dos indivíduos e, embora animais obesos apresentem altas concentrações dessa adipocina, há uma falha em sua resposta devido a uma saturação de sistemas de transporte, que diminui a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (ZORRAN, 2010; LEAL, 2013). Frente a isso, o centro de saciedade não é ativado e ocorre manutenção do balanço energético positivo, com maior acúmulo de gordura. Por consequência, o organismo desenvolve hiperleptinemia crônica devido a uma resistência à LP (ABEL, 2012).

A maioria dos estudos tem estimado indiretamente o grau de obesidade canina a partir do ECC. Partindo da premissa de que a Leptina plasmática (LP) é uma proteína pró-inflamatória que expressa muito melhor o aumento da adiposidade, nós realizamos um estudo para investigar a hipótese de que a

hiperleptinemia está diretamente correlacionada com o aumento do estresse oxidativo sistêmico de cães com sobrepeso e obesos.

## **Material e Métodos**

### **Delineamento experimental**

De acordo com os princípios éticos em uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo FOA - N° 2014/01343), foi realizado um estudo observacional transversal controlado para comparar os marcadores de estresse oxidativo de cães controle apresentando ECC ideal, com os de cães com sobrepeso e obesos.

### **Animais**

Foram selecionados 121 cães de diversas raças, com idades entre 1 e 12 anos, 41 machos e 80 fêmeas procedentes de proprietários da cidade de Araçatuba – SP (Tabela 1), agrupados conforme o escore de condição corporal (ECC) preconizado por LAFLAMME (2006). Todos os cães foram submetidos a exame físico geral, anamnese, hemograma completo e análise do perfil bioquímico plasmático (ureia, creatinina, proteína total, colesterol, triglicerídeos, FA, ALT e AST). Para avaliar o estresse oxidativo, foi quantificado no plasma a capacidade antioxidante total (TAC), a concentração de oxidante total (TOC), o índice de estresse oxidativo (TAC/TOC x 100), a concentração plasmática leptina, peroxidação lipídica (TBARS) e principais antioxidantes endógenos (GGT, ácido úrico e albumina).

**Tabela 1** - Caracterização dos cães de acordo com escore de condição corporal (ECC) de Laflamme (1997): Controle (ECC 4-5), sobrepeso (ECC 6-7) e obesos (ECC 8-9)

<b>Características</b>	<b>Controle (n=38)</b>	<b>%</b>	<b>Sobrepeso (n=39)</b>	<b>%</b>	<b>Obeso (n=44)</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>						
Fêmea	23	60.53	27	69.23	32	72.73
Macho	15	39.47	12	30.77	12	27.27
<b>Estado Reprodutivo</b>						
Castrado	18	47.37	22	56.41	23	52.27
Não Castrado	20	52.63	17	43.59	21	47.73
<b>Faixa etária (anos)</b>						
1 - 6 anos	27	71.05	19	48.72	25	56.82
> 6 anos	11	28.95	20	51.28	19	43.18
<b>Raça</b>						
SRD	16	42.11	11	28.21	19	43.18
Labrador	1	2.63	6	15.38	7	15.91
Poodle	4	10.53	4	10.26	5	11.36
Dachshund	1	2.63	3	7.69	2	4.55
Pug	0	0.00	1	2.56	3	6.82
Pit bull	3	7.89	1	2.56	0	0.00
Rottweiler	2	5.26	1	2.56	1	2.27
Outros	11	28.95	12	30.77	7	15.91

Os critérios de inclusão para o grupo controle (n = 39) foram a ausência de quaisquer alterações na anamnese, exame físico geral e exames complementares e com ECC 4 ou 5. O grupo com sobrepeso (n = 38) foi constituído por animais com ECC 6 ou 7 e o grupo obeso (n = 44) constituído por animais com ECC 8 ou 9. Foram excluídos de todos os três grupos os cães que apresentavam alterações clínicas compatíveis com hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo e sorologia positiva para leishmaniose visceral canina pelo método de ELISA (LIMA et al., 2003).

### **Obtenções de amostras e análises laboratoriais**

Após jejum alimentar de oito horas, 20 mL de sangue total foram colhidos por venopunção da veia jugular, sendo 1 mL armazenado em tubo contendo 20mg de EDTA-Na 10% (M/V) para a realização de hemograma e o restante dividido em dois tubos tipo Vacutainer® heparinizados (BD Vacutainer® Plus com Heparina, Becton-Dickson, New Jersey, USA). O plasma heparinizado foi obtido por centrifugação do sangue total (2750 g/ 10') e armazenado no máximo por 3 meses, sob proteção da luz a -80°C.

O hemograma completo foi realizado com o auxílio de contador eletrônico de células sanguíneas (BC-2800 Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Nanshan, China) e a proteína plasmática total aferida por meio de refratômetro manual. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corados com corante hematológico panótico rápido comercial (Instant-Prov, Newprov, Pinhais-PR).

Todas as análises bioquímicas plasmáticas foram realizadas em analisador bioquímico automatizado (BS 200, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Nanshan, China), previamente ajustado com calibrador comercial e controles níveis I e II (Biosystems, Barcelona, Spain). Utilizando conjunto de reativos comerciais (Biosystem, Barcelona, Spain), foi mensurada a concentração plasmática de ácido úrico pelo método enzimático (uricase/peroxidase); albumina pelo método do verde de bromocresol; GGT pelo método enzimático UV (urease/glutamato desidrogenase; FA pelo método dietanolamina; colesterol pelo método enzimático (oxidase/peroxidase); creatinina pelo método cinético (picrato alcalino); proteína total pelo método do biureto; triglicerídeos pelo método do glicerol fosfato (oxidase/peroxidase) e uréia pelo método enzimático UV (urease/glutamato desidrogenase). Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C conforme orientações dos fabricantes.

A TAC plasmática foi determinada pelo método descrito por Erel (2004) e os resultados expressos em equivalente  $\mu\text{mol}$  de Trolox/L. A TOC plasmática foi quantificada pelo método descrito por Erel (2005) e os resultados expressos em equivalente  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio/L. O índice de estresse oxidativo foi calculado da seguinte forma:  $\text{IEO (\%)} = 100 \times [\text{TOC/TAC}]$  (AYCICEK et al., 2005).

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada pelo método de TBARS (HUNTER et al., 1985), com auxílio de uma leitora ELISA automática (Robotnik, Elisa Plate Analyser, Índia) e absorvância de 540 nm.

A concentração de leptina plasmática foi determinada pelo método de imunoenensaio enzimático (ELISA) do tipo “sanduíche” utilizando-se teste comercial (Canine Leptin ELISA Kit EZCL-31K, Merck Millipore, Missouri, Estados Unidos) segundo recomendações do fabricante. Efetuou-se a leitura da placa com auxílio de uma leitora ELISA automática (Robotnik, Elisa Plate Analyser, Índia) e absorvância de 450 nm.

### **Análise estatística**

As variáveis foram testadas quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. Para a correlação entre as variáveis foi utilizado o teste de Spearman e para avaliar a significância das diferenças entre os grupos foram empregados os testes de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio de um programa computacional (GraphPad software, versão 7.0, 2016), sendo considerado significativo *p-value* menor que 0,05 e nestes casos foram calculados o valor beta ( $\beta$ ) e poder do teste ( $1-\beta$ ).

## Resultados

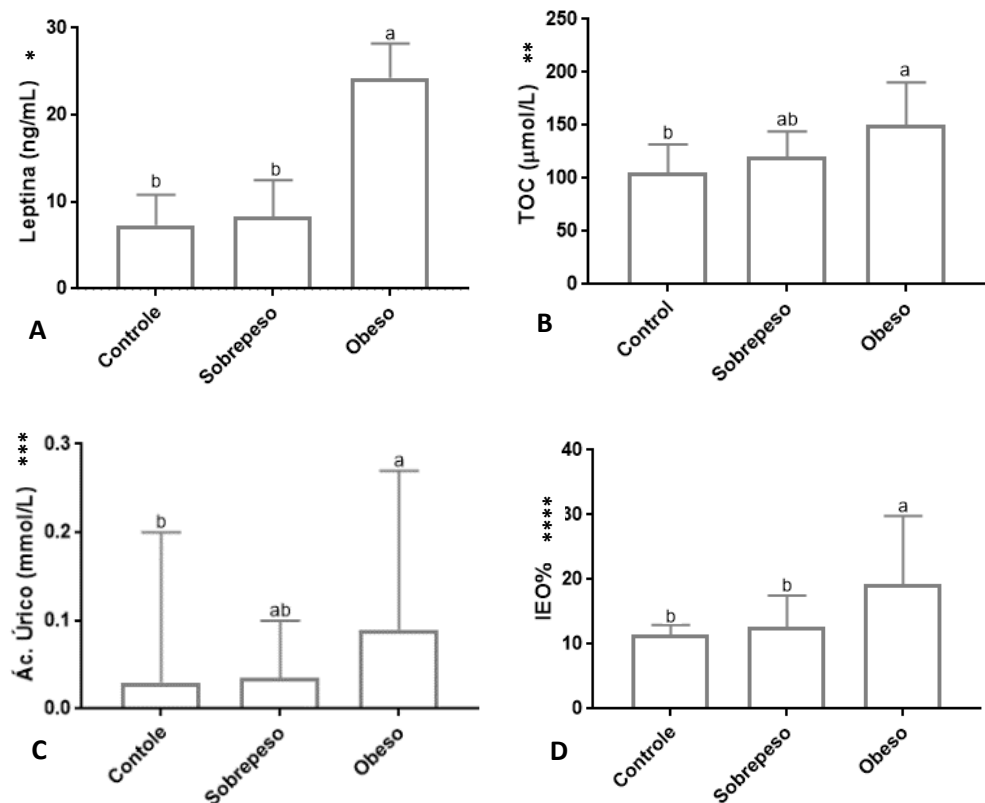
O grupo controle expressou valores dentro da normalidade para o hemograma (JAIN, 1986) e perfil bioquímico (KANEKO et al., 1998) considerados para espécie canina. Os cães obesos apresentaram valores de proteína total, colesterol e FA significativamente maiores, porém dentro da normalidade considerada para espécie. A concentração plasmática de triglicerídeos teve correlação positiva com o ECC ( $r=0,5785$ ,  $p<0,0001$ ) e foi significativamente maior em cães com sobrepeso e obesos (Tabela 2).

**Tabela 2** - Perfil hematológico e bioquímico plasmático de cães de acordo com seu escore de condição corporal (ECC) de Laflamme (1997): Controle (ECC 4-5), sobrepeso (ECC 6-7) e obeso (ECC 8-9)

<i>Exames laboratoriais</i>	<b>Controle (n=38)</b>	<b>Sobrepeso (n=39)</b>	<b>Obeso (n=44)</b>
<b>Hemograma</b>			
Volume globular (%)	49,27 ± 5,25 <sup>a</sup>	48,69 ± 10,22 <sup>a</sup>	49,64 ± 5,09 <sup>a</sup>
Hemácias (10 <sup>6</sup> /μL)	6,78 ± 0,70 <sup>a</sup>	6,96 ± 0,96 <sup>a</sup>	6,88 ± 0,63 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	16,85 ± 1,95 <sup>a</sup>	17,27 ± 2,28 <sup>a</sup>	17,11 ± 2,42 <sup>a</sup>
VCM (fL)	72,77 ± 2,77 <sup>a</sup>	72,20 ± 3,35 <sup>a</sup>	71,85 ± 3,05 <sup>a</sup>
CHCM (%)	34,06 ± 1,28 <sup>a</sup>	34,04 ± 2,15 <sup>a</sup>	34,50 ± 2,18 <sup>a</sup>
Leucócitos totais (10 <sup>9</sup> /L)	10,55 ± 3,59 <sup>a</sup>	11,86 ± 9,01 <sup>a</sup>	11,61 ± 3,50 <sup>a</sup>
<b>Bioquímica plasmática</b>			
ALT (UI/L)	42,6 ± 23,31 <sup>a</sup>	46,15 ± 30,03 <sup>ab</sup>	57,54 ± 34,95 <sup>b</sup>
AST (UI/L)	28,28 ± 9,13 <sup>a</sup>	28,72 ± 9,58 <sup>a</sup>	30,04 ± 7,87 <sup>a</sup>
Colesterol (mmol/L)	5,35 ± 1,78 <sup>ab</sup>	4,67 ± 1,41 <sup>a</sup>	5,73 ± 1,54 <sup>b</sup>
Creatinina (μmol/L)	105,4 ± 22,88 <sup>a</sup>	94,71 ± 24,4 <sup>a</sup>	93,96 ± 2,64 <sup>a</sup>
Glicose (mmol/L)	5,22 ± 0,86 <sup>a</sup>	5,21 ± 0,98 <sup>a</sup>	5,38 ± 0,86 <sup>a</sup>
Proteína total (g/L)	62,31 ± 7,09 <sup>a</sup>	63,73 ± 7,44 <sup>a</sup>	68,2 ± 13,56 <sup>b</sup>
Ureia (mmol/L)	6,03 ± 1,51 <sup>a</sup>	5,18 ± 1,60 <sup>a</sup>	5,36 ± 1,71 <sup>a</sup>
FA (UI/L)	42,07 ± 21,84 <sup>a</sup>	53,43 ± 45,72 <sup>ab</sup>	68,21 ± 54,33 <sup>b</sup>
Triglicerídeos (mmol/L)	0,62 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,66 <sup>b</sup>	1,55 ± 1,19 <sup>b</sup>
Cálcio (mmol/L)	2,39 ± 0,21 <sup>ab</sup>	2,29 ± 0,28 <sup>a</sup>	2,48 ± 0,83 <sup>b</sup>
Fósforo (mmol/L)	2,99 ± 10,82 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,40 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,28 <sup>a</sup>
Albumina (g/L)	31,8 ± 3,37 <sup>a</sup>	31,26 ± 5,18 <sup>a</sup>	33,3 ± 4,19 <sup>a</sup>
Ácido úrico (mmol/L)	0,03 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,06 ± 0,09 <sup>b</sup>
Bilirrubina (μmol/L)	10,66 ± 3,66 <sup>a</sup>	11,08 ± 4,51 <sup>a</sup>	12,12 ± 5,47 <sup>a</sup>
GGT (UI/L)	4,22 ± 1,71 <sup>a</sup>	4,24 ± 2,03 <sup>a</sup>	3,73 ± 1,72 <sup>a</sup>
TAC (μmol de equivalente Trolox/L)	77,45 ± 28,46 <sup>a</sup>	78,95 ± 19,91 <sup>a</sup>	79 ± 24,67 <sup>a</sup>
TBARS (μmol)	8,861 ± 6,037 <sup>a</sup>	10,35 ± 6,457 <sup>a</sup>	12,26 ± 8,447 <sup>a</sup>

\* Letras desiguais indicam diferença estatística ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo controle

A LP de cães obesos foi maior (Figura 1) e sua correlação com o grau de obesidade (ECC) foi forte e positiva ( $r=0,8$ ,  $p<0,0001$ ).



**Figura 1.** Valores da concentração plasmática de leptina (A), TOC (B), Concentração de Ácido úrico (C) e IEO (D) de cães de acordo com seu escore de condição corporal (ECC): Controle (ECC 4-5), sobrepeso (ECC 6-7) e obeso (ECC 8-9), representados por mediana e intervalo de confiança. \*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (\*  $p<0,05$  e  $1-\beta=89,39\%$ ; \*\*  $p<0,005$  e  $1-\beta=95,41\%$ ; \*\*\* $p<0,0484$  e  $1-\beta=21,44\%$ ; \*\*\*\* $p<0,0023$  e  $1-\beta=72,41\%$ ).

Os antioxidantes endógenos: albumina, bilirrubina total e GGT não diferiram entre os grupos (Tabela 2). A correlação do ácido úrico plasmático foi positiva com o ECC ( $p=0,0016$ ,  $r=0,2839$ ) e LP ( $r=0,25$ ,  $p=0,025$ ). Embora a concentração desse antioxidante tenha sido maior em cães obesos (Figura 1), não foi observado diferenças ( $p=0,8348$ ) entre os grupos quanto a TAC (Tabela 2).

Em cães obesos, o IEO foi maior que dos demais grupos, sendo a TOC mais elevada quando comparado ao controle (Figura 1). A correlação do IEO com LP ( $r=0,25$ ,  $p=0,025$ ) e ECC IEO ( $r=0,35$ ,  $p=0,0001$ ) foi positiva. O TOC



também apresentou uma correlação positiva com a LP (0,25,  $p=0,0027$ ) e com IEO ( $r=0,3434$ ,  $p=0,0002$ ). Embora cães obesos tenham maior IEO e TOC, não houve diferença quanto a peroxidação lipídica plasmática (Tabela 2) estimada por TBARS ( $p=0,1163$ ).

## Discussão

O estado de hígidez dos cães do grupo controle foi confirmado pelos exames laboratoriais, cujos valores variaram dentro da faixa de referência do perfil hematológico (JAIN, 1986) e bioquímicos plasmáticos considerados para a espécie (KANEKO et al., 1998). A hipertrigliceridemia dos cães obesos é compatível com o grau de obesidade e similares aos descritos em outro estudo (TRIBUDDHARATANA et al., 2011).

As adipocitocinas como a LP atuam no controle do apetite (LEAL, 2013), sendo consideradas bons índices de adiposidade em cães, independentemente da idade e raça (ISHIOKA et al., 2007). Neste sentido nós mensuramos a LP e correlacionamos com o ECC de cães de diversas raças, idades e sexos, confirmando relatos anteriores de que a LP tem correlação direta com os parâmetros morfométricos (JEUSETTE et al., 2005) e com o grau de adiposidade (TVARIJONAVICIUTE et al., 2012). Sabe-se que a LP é um hormônio diretamente relacionado à quantidade de tecido adiposo no organismo, ou seja, indivíduos obesos apresentam hiperleptinemia (ISHIOKA et al., 2007; BLAND; HILL, 2011).

A LP é uma adipocina proteica pró-inflamatória (JEUSETTE et al., 2005) e nos últimos anos têm se buscado entender como o acúmulo de gordura corporal por si só aumenta o estresse oxidativo sistêmico (EOS) independente da presença de hiperglicemia (ISHIOKA et al., 2007) e como a hiperleptinemia contribui para esta alteração (JEUSETTE et al., 2005; SAGAWA et al., 2002). A hiperleptinemia tem sido associada ao estado pró-inflamatório crônico na obesidade, sendo responsável pela ativação de macrófagos, produção de fator

de necrose tumoral alfa e de óxido nítrico-sintase, além da proliferação e migração de células endoteliais. Dessa forma, o aumento do EOS na obesidade pode estar relacionado à produção desregulada de tal adipocina (ISHIOKA et al., 2007; ABEL, 2012).

Ficou bem caracterizado que alguns marcadores mensurados nos cães com sobrepeso (LP, Ácido úrico e IEO) têm valores intermediários entre os cães controle e obesos, sugerindo que o EOS da obesidade é progressivo e provavelmente depende do tempo exposição ao aumento da adiposidade corporal.

As informações sobre o EOS em cães são escassas, não havendo até o momento valores de referência confiáveis para o TAC, TOC e IEO. Os valores de TAC e TOC dos cães controle foram inferiores aos relatados em outros estudos de nosso grupo (ALMEIDA et al., 2013). Sabidamente diferenças quanto à sensibilidade de equipamentos, forma e tempo de conservação das amostras e origem dos reagentes interferem nos resultados de TAC (EREL, 2004) e TOC (EREL, 2005).

Diversos marcadores têm sido empregados para avaliar EOS na obesidade em humanos (PIRGON et al., 2013; WANG et al., 2014) e ratos (FURUKAWA et al., 2004), entretanto quando comparado à análise individual de outros marcadores, o IEO é considerado mais sensível para detectar EOS (AYCICEK et al., 2005), porém para fins de comparação, não encontramos registros da avaliação do IEO em cães obesos. Diferentemente do EOS descrito em humanos obesos (PIRGON et al., 2013), na obesidade canina o IEO foi associado à elevação de TOC sem diminuição de TAC. Em cães com obesidade experimentalmente induzida também não foi observada diminuição de TAC (VAN DE VELDE et al., 2012).

As informações sobre alterações nas concentrações plasmáticas de endógenos plasmáticos de cães obesos são escassas (GERMAN, 2006; TRIBUDDHARATANA et al., 2011; FORSTER et al., 2012). Embora tenha sido associada com a obesidade e à gordura corporal total em humanos (CHOI et al., 2003), a atividade da GGT como marcador de EOS em cães obesos é

controversa (TRIBUDDHARATANA et al., 2011). Assim como já relatado na obesidade canina (FORSTER et al., 2012; RICCI et al., 2010) não observamos alteração na atividade plasmática de GGT. Acredita-se que a associação entre GGT e a obesidade canina seja decorrente da colestase oriunda do depósito de gordura no tecido hepático (TRIBUDDHARATANA et al., 2011). A colestase parece não ter ocorrido uma vez que a atividade de FA e bilirrubina total ficaram dentro dos valores de normalidade para a espécie nos cães com sobrepeso e obesos.

A albumina é sabidamente um importante antioxidante que diminui em cães obesos após regime de emagrecimento (GERMAN, 2006; FORSTER et al., 2012; YAMKA et al., 2006; YAMKA et al., 2007). As concentrações plasmáticas de albumina dos cães obesos ficaram próximas dos limites superiores de normalidade da espécie. Há de se confirmar se este valor mais alto reflete um dos mecanismos compensatórios para o controle do EOS.

O ácido úrico é um sequestrador de radicais livres e fornece 60% da capacidade antioxidante do plasma humano (AMES et al., 1981). Por ser sintetizado principalmente pelo fígado e excretado na urina, o aumento da concentração plasmática associada a uma maior taxa de excreção renal de urato em homens obesos sugere que há uma superprodução de ácido úrico na obesidade visceral (TAMBA et al., 2008). A maior concentração plasmática de ácido úrico descrita na obesidade humana (ABDUL-MAJEED, 2009) e de roedores (TSUSHIMA et al., 2013) também ocorreu nos cães obesos. Entretanto, esta maior concentração de ácido úrico não foi suficiente para equilibrar a relação entre antioxidantes e oxidantes plasmáticos, diante de uma maior concentração de TOC de modo que o IEO foi maior nos cães obesos.

O TBARS é um indicador indireto da peroxidação lipídica que reflete o aumento do EOS na obesidade humana (KONUKOGLU et al., 2006; ESTERBAUER et al., 1993) e de roedores (FURUKAWA et al., 2004; BELTOWSKI, 2012). Entretanto índices elevados de TBRAS não foram observados, assim como em cães obesos submetidos a uma dieta de engorda por um curto período de tempo (VAN DE VELDE et al., 2012), sugerindo que tal

alteração depende do tempo de desenvolvimento da obesidade. Há de se ressaltar que apenas 29% dos responsáveis pelos animais tinham a informação do tempo que o animal começou a apresentar aumento de peso, com uma média de 52 meses antes da coleta dos dados.

Os principais alvos das ERO são as gorduras poli-insaturadas das membranas celulares, o que resulta na peroxidação lipídica e consequente danos na estrutura e função das células (ESTERBAUER et al., 1993). Embora o aumento de TBARS não tenha sido significativo, é razoável supor que o EOS na obesidade crônica possa contribuir para os problemas renais (CHAGNAC et al., 2000), hepático e cardiovascular (GERMAN, 2006) já relatados em cães.

Apesar da limitação que envolve um estudo observacional quanto a variabilidade dos cães em relação a raça, idade, diferenças de alimentação fornecida pelos proprietários, a variação quanto ao tempo de sobrepeso ou obesidade, foi possível evidenciar a correlação entre o grau de obesidade canina, o EOS e o aumento de LP. Esta é provavelmente a primeira evidência de que a hiperleptinemia está associada positivamente ao EOS na obesidade canina. Diante desse novo cenário, torna-se necessário entender melhor os mecanismos do EOS da obesidade e suas implicações clínicas. Um melhor entendimento sobre o tema permitirá orientar novas estratégias terapêuticas e nutricionais para controle do EOS em cães obesos com o objetivo de prevenir complicações clínicas que podem estar associadas a este distúrbio nutricional.

## REFERÊNCIAS

ABDUL-MAJEED, A.A. Relationship Between Uric Acid and Obesity. **Al-Anbar Medical Journal** v.7, n.1, p.19-23, 2009.

ABEL, E. D.; SWEENEY, G.. Modulation of the cardiovascular system by leptin. **Biochimie**, v. 94, n. 10, p. 2097-2103, 2012.

ALMEIDA, B. F. M. et al. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 599-605, 2013..

AMES, B. N. et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 11, p. 6858-6862, 1981.

APTEKMANN, K. P. et al. Nutritional and environment aspects of canine obesity. **Ciencia Rural**, v. 44, n. 11, p. 2039-2044, 2014.

AYCICEK, A.; EREL, O.; KOCYIGIT, A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. **Pediatrics International**, v. 47, n. 6, p. 635-639, 2005.

BACH, J. F. et al. Association of expiratory airway dysfunction with marked obesity in healthy adult dogs. **American journal of veterinary research**, v. 68, n. 6, p. 670-675, 2007.

BEŁTOWSKI, J.. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 2, p. 168-178, 2012.

BLAND, I.; HILL, J. Tackling dog obesity by tackling owner attitudes. **Animal Science Reviews 2011**, p. 11, 2012.

BURKHOLDER, W. J.; TOLL, P.W. Obesity. In: HAND, M. S. et al. **Small animal of clinical nutrition**. 4 ed. Kansas: Mark Morres Institute, 2000.p. 401-430.

CĂTOI, A. F. et al. Nitric oxide, oxidant status and antioxidant response in morbidly obese patients: the impact of 1-year surgical weight loss. **Obesity surgery**, v. 23, n. 11, p. 1858-1863, 2013.

CHAGNAC, A. et al. Glomerular hemodynamics in severe obesity. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 278, n. 5, p. F817-F822, 2000.

CHOI, J. W. Association between elevated serum hepatic enzyme activity and total body fat in obese humans. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 33, n. 3, p. 257-264, 2003.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103-1111, 2005.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

Esterbauer, H.; Wäg, G.; Puhl, H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. **British Medical Bulletin**, v 49, p. 566-576, 1993.

FERREIRA, A. L. A. et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 1, p. 54-61, 2011..

FORSTER, G. M. et al. Nutritional weight loss therapy with cooked bean powders regulate serum lipids and biochemical analytes in overweight and obese dogs. **J Obes Wt Loss Ther**, v. 2, n. 149, p. 2, 2012.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752, 2004.

GERMAN, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1940S-1946S, 2006.

HUNTER, M. I. S.; NLEMADIM, B. C.; DAVIDSON, D. L. W. Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. **Neurochemical research**, v. 10, n. 12, p. 1645-1652, 1985.

ISHIOKA, K. et al. Plasma leptin concentration in dogs: effects of body condition score, age, gender and breeds. **Research in veterinary science**, v. 82, n. 1, p. 11-15, 2007

JAIN, N. C. Hematologic techniques, erythrocyte osmotic fragility test. **Schalm's Veterinary Hematology**, p. 69-71, 1986.

JEUSETTE, I. C. et al. Effect of breed on body composition and comparison between various methods to estimate body composition in dogs. **Research in veterinary science**, v. 88, n. 2, p. 227-232, 2010.

JEUSETTE, I. C. et al. Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 66, n. 1, p. 81-86, 2005.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Express, 6. ed. 1998 p.936.

KONUKOGLU, D.; SERIN, O.; TURHAN, M. S. Plasma leptin and its relationship with lipid peroxidation and nitric oxide in obese female patients with or without hypertension. **Archives of medical research**, v. 37, n. 5, p. 602-606, 2006.

LAFLAMME, D. P. Understanding and managing obesity in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 36, n. 6, p. 1283-1295, 2006.

LEAL, V. de O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 419, p. 87-94, 2013.

LIMA, V. M. F. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 485-489, 2003.

MATSUZAWA-NAGATA, Naoto et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism**, v. 57, n. 8, p. 1071-1077, 2008.

MOSCHEN, A. R. et al. Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 7-8, p. 840, 2011.

OZATA, M. et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clinical biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 627-631, 2002.

PIRGON, Ö. et al. Association between insulin resistance and oxidative stress parameters in obese adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of clinical research in pediatric endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 33, 2013.

RICCI, R. et al. Body condition score (BCS) and metabolic status of shelter dogs. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. sup1, p. 859-861, 2007.



RUTKOWSKI, P. et al. Renal disease in obesity: the need for greater attention. **Journal of renal nutrition**, v. 16, n. 3, p. 216-223, 2006.

SAGAWA, M. M. et al. Correlation between plasma leptin concentration and body fat content in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 63, n. 1, p. 7-10, 2002.

SUZUKI, S. et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. **Diabetes research and clinical practice**, v. 45, n. 2, p. 161-168, 1999.

TAMBA, S. et al. Relationship between the serum uric acid level, visceral fat accumulation and serum adiponectin concentration in Japanese men. **Internal medicine**, v. 47, n. 13, p. 1175-1180, 2008.

THENGCHAI SRI, N. et al. Abdominal obesity is associated with heart disease in dogs. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 131, 2014.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010.

TRIBUDDHARATANA, T. et al. Biochemical alterations and their relationships with the metabolic syndrome components in canine obesity. **Kasetsart J.(Nat. Sci.)**, v. 45, p. 622-628, 2011.

TSUSHIMA, Y. et al. Uric acid secretion from adipose tissue and its increase in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 27138-27149, 2013.

TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Obesity-related metabolic dysfunction in dogs: a comparison with human metabolic syndrome. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 147, 2012.

TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Effect of weight loss on inflammatory biomarkers in obese dogs. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 2, p. 570-572, 2012.

TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Obese dogs with and without obesity-related metabolic dysfunction—a proteomic approach. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 211, 2016.

VAN DE VELDE, H. et al. Short-term increase of body weight triggers immunological variables in dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 145, n. 1, p. 431-437, 2012.

WANG, Y. et al. Diets high in total antioxidant capacity improve risk biomarkers of cardiovascular disease: a 9-month observational study among overweight/obese postmenopausal women. **European journal of nutrition**, v. 53, n. 6, p. 1363-1369, 2014.

YAMKA, R. M.; FRANTZ, N. Z.; FRIESEN, K. G. Effects of 3 canine weight loss foods on body composition and obesity markers. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 5, n. 3, p. 125, 2007.

YAMKA, R. M.; FRIESEN, K. G.; FRANTZ, N. Z. Identification of canine markers related to obesity and the effects of weight loss on the markers of interest. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 4, p. 282, 2006.

ZAMZAMI, N. et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. **FEBS letters**, v. 384, n. 1, p. 53-57, 1996.

ZORAN, D. L. Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 40, n. 2, p. 221-239, 2010.