

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta TESE será
disponibilizado somente a partir
de **28/11/2018**.

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

**ASSOCIAÇÃO DA OBESIDADE COM A ATIVAÇÃO DO
METABOLISMO OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS EM
CÃES**

Anelise Maria Bosco

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2017

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

**ASSOCIAÇÃO DA OBESIDADE COM A ATIVAÇÃO DO
METABOLISMO OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS EM
CÃES**

Anelise Maria Bosco

Orientador: Prof. Adj. Paulo César Ciarlini

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

ARAÇATUBA – SP

2017

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

*Aos meus pais, Fátima e Valdir, por todo o apoio e incentivo dedicados aos meus estudos e por sempre acreditarem na minha capacidade.
À minha avó Lia por sempre orar e acreditar em meu sucesso.*

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus, por sempre guiar meus caminhos, me protegendo e reservando boas surpresas.

Aos meus pais pelo amor e carinho que vocês me proporcionaram durante toda minha existência, abrindo muitas vezes mão de seus sonhos em função dos meus. Também ao meu irmão Luís e aos meus avôs Lia e Antenor, a todos eles meu amor e minha gratidão por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador Professor Adjunto Paulo César Ciarlini por todo apoio, amizade e ensinamentos transmitidos durante esse período. Exemplo de competência, ética e profissionalismo.

Aos meus amigos de Araçatuba-SP e Guarapuava-PR, em especial Veridiana Ribeiro e Cintia Santos. Agradeço também às colegas da turma 07 de especialização em patologia clínica de Jaguariúna-SP e em especial à Gabriela Zambão pela grande amizade. À minha orientadora na graduação Prof.^a Dr.^a Liane Ziliotto pelo apoio e estímulo à pesquisa durante o período de faculdade.

Aos grandes colegas de Laboratório Clínico Veterinário do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Luis Gustavo, Flávia Yamamoto, Laine Gabas, Lillian Baptistioli, Luciana de Moraes, Daniela Matono, Rosemeire Parra e Daniel José. Ao Dr. Breno Fernando pelas orientações, ensinamentos e amizade que foram essenciais para finalização desse trabalho. À Taiana Valadares pela parceria e amizade durante a realização do projeto.

Em especial à Ariana Ferreira e Amanda Pinatti que além de colegas de laboratório se tornaram amigas que levarei para o resto da vida. “Era uma pessoa igual a cem mil outras pessoas. Mas, eu fiz dela um amigo, agora ela é única no mundo”.

Aos professores doutores, Valéria Marçal Félix de Lima, Luciana Del Rio Pinoti e Wagner Luís Ferreira, por todo o auxílio na execução desse projeto de pesquisa e pela tão estimada disposição a ajudar no que fosse preciso.

Aos cães, objeto de estudo da presente pesquisa.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa auxílio de doutorado concedida (2015/06467-3) e pelo financiamento (2014/20662-0).

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 doutorado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução dessa pesquisa, sem vocês nada disso seria possível!

Meus sinceros agradecimentos!

ASSOCIAÇÃO DA OBESIDADE COM A ATIVAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS EM CÃES

RESUMO – A obesidade apresenta alta incidência e está associada com a hiperleptinemia. Há evidências de que a leptina tem um receptor presente em neutrófilos e é capaz de influenciar a sua capacidade oxidativa. Além disso, sabe-se que a ativação do metabolismo oxidativo nos neutrófilos de humanos obesos contribui para o estresse oxidativo. Até o momento, os mecanismos pelos quais a hiperleptinemia altera a produção de superóxido pelos neutrófilos em cães são desconhecidos. Nesse sentido, foi investigada a hipótese de que cães com hiperleptinemia apresentam uma ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Para tal, um grupo controle (n=24) foi constituído de cães com bom escore corporal e foi comparado com um grupo obeso (n=25) e sobrepeso (n=27). Foram constituídos mais dois subgrupos: cães com hiperleptinemia e sem hiperleptinemia, agrupados conforme o intervalo de confiança de 95% obtido dos valores de leptina plasmática do grupo controle. Foram mensuradas as alterações dos marcadores de obesidade (adiponectina e leptina plasmáticas) e marcadores de estresse oxidativo sistêmico (capacidade antioxidante total, concentração de oxidante total, índice de estresse oxidativo e peroxidação lipídica plasmática). O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi avaliado por citometria de fluxo capilar utilizando as sondas hidroetidina e 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína com ou sem estímulo de acetato miristato de forbol (PMA). Nos animais com hiperleptinemia, assim como no grupo obeso, foi observada maior produção de superóxido pelos neutrófilos sob estímulo do PMA e presença de estresse oxidativo sistêmico. Essa é provavelmente uma das primeiras evidências de que ocorre uma pré-ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos circulantes de cães com hiperleptinemia, condição que favorece o estresse oxidativo sistêmico na espécie canina.

Palavras-Chave: Leptina, polimorfonuclear, apoptose, estresse oxidativo.

ASSOCIATION OF OBESITY WITH THE ACTIVATION OF NEUTROPHIL OXIDATIVE METABOLISM IN DOGS

SUMMARY – Obesity has a high incidence and is associated with hyperleptinemia. It is already known that leptin has a receptor present in neutrophils, regulating its oxidative capacity. In addition, the activation of oxidative metabolism of neutrophils from obese humans contributes to oxidative stress. To date, the mechanisms by which hyperleptinemia alters the production of superoxide by neutrophils in dogs are still unknown. In this sense, we investigated the hypothesis that dogs with hyperleptinemia present an activation of oxidative metabolism of neutrophils. For this, a control group (n=24) was composed of dogs with good body score and was compared with an obese (n=25) and overweight (n=27) groups. Two more subgroups were formed: dogs with and without hyperleptinemia, grouped according to the 95% confidence interval obtained from the plasma leptin levels of the control group. Changes in the markers of obesity (plasma adiponectin and leptin), markers of oxidative stress (total antioxidant capacity, total oxidant concentration, oxidative stress index, and plasma lipid peroxidation) were measured. The oxidative metabolism of neutrophils was evaluated by capillary flow cytometry using the probes hydroetidine and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate with or without phorbol myristate acetate (PMA) stimuli. In animals with hyperleptinemia, as well as in obese group, we observed higher superoxide production by neutrophils under PMA stimulation and presence of systemic oxidative stress. This is probably one of the first evidences that a pre-activation of the oxidative metabolism in circulating neutrophils occurs in dog with hyperleptinemia, a condition that favors the systemic oxidative stress in dogs.

Keywords: Leptin, polymorphonuclear, apoptosis, oxidative stress.

REFERÊNCIAS

ABELLA, V.; SCOTECE, M.; CONDE, J.; PINO, J.; GONZALEZ-GAY, M. A.; GÓMEZ-REINO, J. J.; MERA, A.; LAGO, F.; GÓMEZ, R.; GUALILLO, O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 100–109, 2017.

ALBUQUERQUE, K. F. F. S.; MARINOVIC, M. P.; MORANDI, A. C.; BOLIN, A. P.; OTTON, R. Green tea polyphenol extract in vivo attenuates inflammatory features of neutrophils from obese rats. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 1261–1274, 2016.

ALMEIDA, B.F.M.; NARCISO, L.G.; MELO, L.M.; PREVE, P.P.; BOSCO, A.M.; LIMA, V.M.F.; CIARLINI, P.C. 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.

ALVES, C. M. O. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; CARVALHO, I. F.; LUCISANO VALIM, Y. M. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta**, v. 30, n. 2-3, p. 601–608, 2003.

ARAZNA, M.; PRUCHNIAK, M. P.; DEMKOW, U. Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: Strategies for escaping from killing. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 187, n. 1, p. 74-77, 2013.

BASTARD, J. P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M. J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v. 17, n. 1, p. 4–12, 2006.

BLANCA, A. J.; RUIZ-ARMENTA, M. V.; ZAMBRANO, S.; SALSOSO, R.; MIGUEL-CARRASCO, J. L.; FORTUÑO, A.; REVILLA, E.; MATE, A.; VÁZQUEZ, C. M. Leptin induces oxidative stress through activation of NADPH

oxidase in renal tubular cells: antioxidant effect of L-carnitine. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 10, p. 2281–2288, 2016.

BOSCO, A. M.; ALMEIDA, B. F. M.; PEREIRA, P. P.; DOS SANTOS, D. B.; NETO, Á. J. S.; FERREIRA, W. L.; CIARLINI, P. C. The uremic toxin methylguanidine increases the oxidative metabolism and accelerates the apoptosis of canine neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 185, p. 14–19, 2017.

BROTFAIN, E.; HADAD, N.; SHAPIRA, Y.; AVINOA, E.; ZLOTNIK, A.; RAICHEL, L.; LEVY, R. Neutrophil functions in morbidly obese subjects. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 181, n. 1, p. 156–163, 2015.

CALDEFIE-CHEZET, F.; POULIN, A.; TRIDON, A.; SION, B.; VASSON, M. P. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 3, p. 414–418, 2001.

CALDEFIE-CHEZET, F.; POULIN, A.; VASSON, M. P. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. **Free Radical Research**, v. 37, n. 8, p. 809–814, 2003.

CHEN, Y.; JUNGER, W. G. Measurement of oxidative burst in neutrophils. **Methods in Molecular Biology**, v. 844, p. 115–124, 2012.

DUPRÉ-CROCHET, S.; ERARD, M.; NÜBE, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 657–670, 2013.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Seminars in Immunopathology**, v. 30, n. 3, p. 279–289, 2008.

ELBIM, C.; LIZARD, G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. **Cytometry Part A**, v. 75, n. 6, p. 475-481, 2009.

FLEGAL, K. M.; KRUSZON-MORAN, D.; CARROLL, M. D.; FRYAR, C. D.; OGDEN, C. L. Trends in obesity among adults in the United States, 2005 to 2014. **JAMA**, v. 315, n. 21, p. 2284–2291, 2016.

FRÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; MURUZÁBAL, F. J.; BURRELL, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 6, p. E827–E847, 2001.

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

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants—quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

KARLSSON, E. A.; BECK, M. A. The burden of obesity on infectious disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 12, p. 1412-1424, 2010.

KAUFMANN, S. H. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 705-712, 2008.

PARK, H. J.; LEE, S. E.; OH, J. H.; SEO, K. W.; SONG, K. H. Leptin, adiponectin and serotonin levels in lean and obese dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n.1, p. 113, 2014.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

ROJANO-RODRIGUEZ, M. E.; BERISTAIN-HERNANDEZ, J. L.; ZAVALETA-

VILLA, B.; MARAVILLA, P.; ROMERO-VALDOVINOS, M.; OLIVO-DIAZ, A. Leptin receptor gene polymorphisms and morbid obesity in Mexican patients. **Hereditas**, v. 153, n. 1, p. 2, 2016.

STILLWELL, S. B.; FINEOUT-OVERHOLT, E.; MELNYK, B. M.; WILLIAMSON, K. M. Searching for the Evidence: strategies to help you conduct a successful search. **American Journal of Nursing**, v. 110, n. 5, p. 51-53, 2010.

SWAIN, S. D.; ROHN, T. T.; QUINN, M. T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 4, n. 1, p. 69-83, 2002.

TROTTIER, M. D.; NAAZ, A.; KACYNSKI, K.; YENUMULA, P. R.; FRAKER, P. J. Functional capacity of neutrophils from class III obese patients. **Obesity**, v. 20, n. 5, p. 1057–1065, 2012.

VAN DE VELDE, H.; JANSSENS, G. P.; STUYVEN, E.; COX, E.; BUYSE, J.; HESTA, M. Short-term increase of body weight triggers immunological variables in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1–2, p. 431–437, 2012.

YAMAZAKI, T.; KAWAI, C.; YAMAUCHI, A.; KURIBAYASHI, F. A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide detection and chronic granulomatous disease diagnosis. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 2, p.41–45, 2011.

ZIELISKA-PRZYJEMSKA, M.; OLEJNIK, A.; DOBROWOLSKA-ZACHWIEJA, A.; GRAJEK, W. In vitro effects of beetroot juice and chips on oxidative metabolism and apoptosis in neutrophils from obese individuals. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 1, p. 49–55, 2009.

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

CAPÍTULO 2 - PRÉ-ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS E ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES COM HIPERLEPTINEMIA

A.M. BOSCO, B.F.M. ALMEIDA, T.C. VALADARES, L. BAPTISTIOLLI, D.J. HOFFMANN, A.A.F. PEREIRA, V.M.F. LIMA, P.C. CIARLINI.

Resumo - A obesidade apresenta alta ocorrência e atualmente constitui a principal doença nutricional da espécie canina. Há evidências de que ocorre aumento de leptina durante o quadro de obesidade. A hiperleptinemia está associada à ativação do metabolismo oxidativo nos neutrófilos de humanos obesos e contribui para o estresse oxidativo. No entanto, em cães obesos, a provável relação entre esta condição e a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos ainda não foi estabelecida. Neste sentido, foi investigada a hipótese de que a ativação dos neutrófilos e o estresse oxidativo sistêmico (EOS) ocorrem em cães com hiperleptinemia. Para tal, foi constituído um grupo controle de 24 cães com escore corporal 4-5, um grupo sobrepeso de 25 cães com escore corporal 6-7 e 27 cães obesos com escore corporal 8-9. Foram formados mais dois subgrupos: cães com hiperleptinemia e sem hiperleptinemia, agrupados conforme o intervalo confiança de 95% obtido dos valores de leptina plasmática do grupo controle. De todos os cães selecionados, foram mensuradas as alterações dos marcadores de obesidade (escore de condição corporal, adiponectina e leptina plasmática), estresse oxidativo plasmático (peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total, capacidade oxidante total e o índice de estresse oxidativo). O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi avaliado em citometria de fluxo pela produção de superóxido com a sonda hidroetidina e pela produção de peróxido de hidrogênio com a sonda 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína, com ou sem estímulo de acetato miristato de forbol (PMA). A apoptose e a viabilidade dos neutrófilos foram quantificadas em citômetro de fluxo capilar utilizando sistema Anexina V-PE, com ou sem efeito indutor de apoptose da camptotecina. Nos cães obesos, foi observado maior estresse oxidativo sistêmico, hiperleptinemia

e neutrófilos pré-ativados com apoptose acelerada. Nos animais com hiperleptinemia, assim como no grupo obeso, observamos maior produção de superóxido pelos neutrófilos sob estímulo do PMA e presença de EOS. Essa é provavelmente uma das primeiras evidências de que na hiperleptinemia ocorre uma pré-ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos circulantes, condição que favorece o estresse oxidativo sistêmico na espécie canina.

Palavras-Chave: obesidade, superóxido, apoptose, polimorfonuclear, leptina.

1 Introdução

A obesidade é a doença nutricional mais comum em cães e sua incidência, assim como ocorre com a obesidade humana, vem crescendo muito rapidamente, tornando-se um dos mais importantes problemas de saúde atual (ZORAN, 2010). O sobrepeso e a obesidade associam-se a várias doenças, afetando a qualidade de vida e reduzindo a expectativa de vida média dos animais (GERMAN, 2006).

O tecido adiposo secreta uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas denominadas adipocinas, como adiponectina e leptina (GERMAN et al., 2010). A leptina é uma proteína sintetizada e secretada principalmente por adipócitos (ISHIOKA et al., 2002) e tem efeito pró-inflamatório e correlaciona-se positivamente com tecido adiposo (ABELLA et al., 2017). Os cães obesos têm aumento significativo nas concentrações de leptina sérica e uma diminuição de adiponectina que tem ação anti-inflamatória (PARK et al., 2014). Um dos efeitos adversos da hiperleptinemia inclui o estresse oxidativo mediado pela ativação da NADPH oxidase (BLANCA et al., 2016). Já se sabe que em humanos, receptores de leptina estão presente em neutrófilos e são capazes de ativar o seu metabolismo oxidativo (CALDEFIE-CHEZET et al., 2003), diferentemente da adiponectina, que inibe a geração de superóxido neutrofílico (MAGALANG et al., 2006) e está associada ao baixo risco de doenças cardiovasculares (HAN et al., 2007).

A produção de superóxido e seus derivados exerce importante função bactericida, entretanto uma produção excessiva desses oxidantes pode resultar no estresse oxidativo (BABIOR, 2000), induzindo o aumento da peroxidação lipídica e apoptose (KATO et al., 2008). O estresse oxidativo tem um papel importante na fisiopatogenia de diversas doenças (KAO et al., 2010; RUSSO; BRACARENSE, 2016).

Até mesmo em humanos sabe-se muito pouco sobre o impacto da obesidade na função neutrofílica. A principal hipótese é a de que o sistema imunológico inato é ativado (NIJHUIS et al., 2009). Os neutrófilos de indivíduos obesos se encontram ativados na ausência e na presença de estímulo (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine e zymozan) favorecendo o estresse oxidativo (BROTFAIN et al., 2015). Entretanto, em cães não se observou diferença na atividade antioxidante, peroxidação lipídica e na produção neutrofílica de espécies reativas de oxigênio (ERO) em animais com obesidade induzida em um curto período de tempo (VAN DE VELDE et al., 2012). A alteração da viabilidade neutrofílica na obesidade ainda é pouco estudada, porém já se sabe que existe um aumento de um marcador apoptótico (M30) no sangue periférico de humanos obesos (TRELAKIS et al., 2012).

As evidências de que as adipocinas regulam a função dos neutrófilos e o estresse oxidativo de humanos obesos ainda não foram estabelecidas na obesidade canina. Neste sentido, foi realizada uma investigação que objetivou confirmar a hipótese de que a ativação dos neutrófilos e o estresse oxidativo sistêmico ocorrem em cães obesos com baixas concentrações plasmáticas de adiponectina e hiperleptinemia. Aditivamente foi analisada a associação entre as adipocinas e as alterações do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e o estresse oxidativo sistêmico.

2 Material e métodos

Foi realizado um estudo observacional transversal e o experimento ocorreu de acordo com os princípios éticos em uso de animais do Comitê de

produzem maior quantidade de superóxido ao longo do tempo e esse aumento pode levar ao estresse oxidativo (FARAH et al., 2010). Fortalecendo tal hipótese, foi possível estabelecer uma correlação positiva entre a LP, o ECC e a produção de superóxido dos neutrófilos *primed* dos cães obesos.

Pouco se sabe sobre as implicações desse aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos na resposta imune inata na obesidade. Em humanos obesos foi descrito um aumento de M30 no sangue, um marcador utilizado para quantificar a apoptose epitelial (TRELLAKIS et al., 2012). Nós observamos uma menor viabilidade e maior taxa de apoptose de neutrófilos em cães obesos. Essa é provavelmente a primeira evidência que na obesidade canina pode ocorrer comprometimento da resposta imune inata já descrita em humanos (MILNER; BECK, 2016). Já se sabe que o estresse oxidativo é um indutor de apoptose celular (KANNAN; JAIN, 2000; YAMAMOTO et al., 2002), porém o estado *primed* dos neutrófilos indica que sua função bactericida está preservada.

Uma vez que a hiperleptinemia e o EOS da obesidade canina estão associados entre si e com a pré-ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, fica evidente a necessidade de entender melhor tais alterações e suas implicações clínicas, a fim de orientar novas estratégias terapêuticas e nutricionais para controle do EOS no cão obeso.

5 Conclusão

A hiperleptinemia na obesidade canina causa pré-ativação dos neutrófilos circulantes, o que parece estar associado ao quadro de estresse oxidativo.

6 Agradecimentos

FAPESP (Proc:2015/06467-3) pela bolsa auxílio de doutorado e pelo financiamento do projeto de pesquisa (Proc. 2014/20662-0).

REFERÊNCIAS

ABDUL-MAJEED, A. A. Relationship Between Uric Acid and Obesity. **Al-Anbar Medical Journal**, v. 9, p. 19–23, 2009.

ABELLA, V.; SCOTECE, M.; CONDE, J.; PINO, J.; GONZALEZ-GAY, M. A.; GÓMEZ-REINO, J. J.; MERA, A.; LAGO, F.; GÓMEZ, R.; GUALILLO, O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 100–109, 2017.

ALBUQUERQUE, K. F. F. S.; MARINOVIC, M. P.; MORANDI, A. C.; BOLIN, A. P.; OTTON, R. Green tea polyphenol extract in vivo attenuates inflammatory features of neutrophils from obese rats. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 1261–1274, 2016.

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.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.

BELTOWSKI, J.; BELTOWSKI, J.; WOJCICKA, G.; WOJCICKA, G.; GORNY, D.; GORNY, D.; MARCINIAK, A.; MARCINIAK, A. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 51, n. 4, p. 883–896, 2000.

BLANCA, A. J.; RUIZ-ARMENTA, M. V.; ZAMBRANO, S.; SALSOSO, R.; MIGUEL-CARRASCO, J. L.; FORTUÑO, A.; REVILLA, E.; MATE, A.; VÁZQUEZ, C. M. Leptin induces oxidative stress through activation of NADPH oxidase in renal tubular cells: antioxidant effect of L-carnitine. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 10, p. 2281–2288, 2016.

BOSCO, A. M.; ALMEIDA, B. F. M.; PEREIRA, P. P.; DOS SANTOS, D. B.; NETO, Á. J. S.; FERREIRA, W. L.; CIARLINI, P. C. The uremic toxin methylguanidine increases the oxidative metabolism and accelerates the apoptosis of canine neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 185, p. 14–19, 2017.

BROTFAIN, E.; HADAD, N.; SHAPIRA, Y.; AVINOAH, E.; ZLOTNIK, A.; RAICHEL, L.; LEVY, R. Neutrophil functions in morbidly obese subjects. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 181, n. 1, p. 156–163, 2015.

CALDEFIE-CHEZET, F.; POULIN, A.; VASSON, M. P. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. **Free Radical Research**, v. 37, n. 8, p. 809–814, 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.

FARAH, R.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; DORLECHTER, F. Primed polymorphonuclear leukocytes constitute a possible link between inflammation and oxidative stress in hyperlipidemic patients: Effect of statins. **Minerva Cardioangiologica**, v. 58, n. 2, p. 175–181, 2010.

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

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. **Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 4–9, 2010.

HAN, S. H.; QUON, M. J.; KIM, J.; KOH, K. K. Adiponectin and Cardiovascular

Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 5, p. 531–538, 2007.

HUNTER, M. I.; NLEMADIM, B. C.; DAVIDSON, D. L. Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. **Neurochemical research**, v. 10, n. 12, p. 1645–52, 1985.

ISHIOKA, K.; SOLIMAN, M. M.; SAGAWA, M.; NAKADOMO, F.; SHIBATA, H.; HONJOH, T.; HASHIMOTO, A.; KITAMURA, H.; KIMURA, K.; SAITO, M. Experimental and Clinical Studies on Plasma Leptin in Obese Dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 4, p. 349–353, 2002.

KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v.7, n.3, p.153-163, 2000.

KAO, M. P. C.; ANG, D. S. C.; PALL, A.; STRUTHERS, A. D. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. **Journal of Human Hypertension**, v. 24, n. 1, p. 1–8, 2010.

KATO, S.; CHMIELEWSKI, M.; HONDA, H.; PECOITS-FILHO, R.; MATSUO, S.; YUZAWA, Y.; TRANAEUS, A.; STENVINKEL, P.; LINDHOLM, B. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 3, n. 5, p. 1526–1533, 2008.

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. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice**, v. 22, n. 4, p. 10–15, 1997.

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.;

FEITOSA, M. M. 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.

LIU, J.; YEO, H. C.; DONIGER, S. J.; AMES, B. N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. **Analytical biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 161–166, 1997.

MAGALANG, U. J.; RAJAPPAN, R.; HUNTER, M. G.; KUTALA, V. K.; KUPPUSAMY, P.; WEWERS, M. D.; MARSH, C. B.; PARINANDI, N. L. Adiponectin inhibits superoxide generation by human neutrophils. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 11–12, p. 2179–2186, 2006.

MILNER, J. J.; BECK, M. A. Micronutrients, immunology and inflammation: The impact of obesity on the immune response to infection. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 298–306, 2016.

NIJHUIS, J.; RENSEN, S. S.; SLAATS, Y.; VAN DIELEN, F. M.; BUURMAN, W. A.; GREVE, J. W. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. **Obesity**, v. 17, n. 11, p. 2014–2018, 2009.

OZATA, M.; MERGEN, M.; OKTENLI, C.; AYDIN, A.; SANISOGLU, S. Y.; BOLU, E.; YILMAZ, M. I.; SAYAL, A.; ISIMER, A.; OZDEMIR, I. C. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 627–631, 2002.

PARK, H. J.; LEE, S. E.; OH, J. H.; SEO, K. W.; SONG, K. H. Leptin, adiponectin and serotonin levels in lean and obese dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n.1, p. 113, 2014.

PAZ-FILHO, G.; MASTRONARDI, C.; FRANCO, C. B.; WANG, K. B.; WONG, M.-L.; LICINIO, J. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 56, n. 9, p. 597–607, 2012.

RAFAJ, R. B.; KULEŠ, J.; TURKOVIĆ, V.; REBSELJ, B.; MRLJAK, V.; KUČER, N. Prospective hematological and biochemical evaluation of spontaneously overweight and obese dogs. **Veterinarski Arhiv**, v. 86, n. 3, p. 383–394, 2016.

RUBIO, C. P.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J. J. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. **BMC Veterinary Research**, v.12, n.1, p.166, 2016.

RUSSO, C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Oxidative stress in dogs. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1431–1440, 2016.

THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

TRELLAKIS, S.; RYDLEUSKAYA, A.; FISCHER, C.; CANBAY, A.; TAGAY, S.; SCHERAG, A.; BRUDEREK, K.; SCHULER, P. J.; BRANDAU, S. Low adiponectin, high levels of apoptosis and increased peripheral blood neutrophil activity in healthy obese subjects. **Obese Facts**, v. 5, n. 3, p. 305–318, 2012.

TRIBUDDHARATANA, T.; KONGPIROMCHEAN, Y.; SRIBHEN, K.; SRIBHEN, K. C. Biochemical alterations and their relationships with the metabolic syndrome components in canine obesity. **Kasetsart Journal - Natural Science**, v. 45, n. 4, p. 622–628, 2011.

TSUSHIMA, Y.; NISHIZAWA, H.; TOCHINO, Y.; NAKATSUJI, H.; SEKIMOTO, R.; NAGAO, H.; SHIRAKURA, T.; KATO, K.; IMAIZUMI, K.; TAKAHASHI, H.; TAMURA, M.; MAEDA, N.; FUNAHASHI, T.; SHIMOMURA, I. Uric acid secretion from adipose tissue and its increase in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 27138–27149, 2013.

VAN DE VELDE, H.; JANSSENS, G. P.; STUYVEN, E.; COX, E.; BUYSE, J.; HESTA, M. Short-term increase of body weight triggers immunological variables in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1–2, p.

431–437, 2012.

WISSE, B. E. The Inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 11, p. 2792–2800, 2004.

YAMAMOTO, A.; TANIUCHI, S.; TSUJI, S.; HASUI, M.; KOBAYASHI, Y. Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed *Staphylococcus aureus*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 129, n. 3, p. 479–484, 2002.

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