

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP
Bibliotecária Responsável: Ana Claudia M. Grieger Manzatti - CRB8-6315

B742a Bosco, Anelise Maria
Associação da obesidade com a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães / Anelise Maria Bosco. --
Araçatuba: [s.n.], 2017.
52f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.
Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

1. Leptina 2. Polimorfonuclear 3. Apoptose 4. Estresse oxidativo I. Título.

CDD 636.0896398



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Associação da obesidade com a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães

AUTORA: ANELISE MARIA BOSCO

ORIENTADOR: PAULO CESAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora 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. FÁBIANO ANTONIO CADIOLI
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. LUCIANA DEL RIO PINOTI
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


Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA
Curso de Medicina Veterinária / Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO

Araçatuba, 27 de novembro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANELISE MARIA BOSCO – Natural de Araçatuba, São Paulo, nascida em 30 de abril de 1987, filha de Aparecida de Fátima do Amaral Bosco e Valdir Bosco. Em 2006, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Centro-Oeste, onde se graduou como Médica Veterinária em dezembro de 2010 com Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Insuficiência renal crônica” sob orientação da Prof.^a Dr.^a Liane Ziliotto. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba-SP, em março de 2012, sob orientação do Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini. Desde então tem participado dos Projetos de Pesquisa do grupo sob auxílio financeiro da FAPESP de onde foi bolsista no mestrado (2011/16018-0) e doutorado (2015/06467-3), sempre em relação aos temas de estresse oxidativo, metabolismo oxidativo de neutrófilos, doença renal crônica e obesidade em cães.

“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!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1 Contextualização do problema.....	14
2 Pesquisa bibliográfica.....	15
3 Revisão sistemática da literatura.....	15
4 Objetivos.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO 2 - PRÉ-ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS E ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES COM HIPERLEPTINEMIA.....	28
1 Introdução.....	29
2 Material e Métodos.....	30
2.1 Seleção dos animais.....	31
2.2 Colheita das amostras e análises laboratoriais.....	32
2.3 Determinação do estresse oxidativo plasmático.....	33
2.4 Determinação das adipocinas plasmáticas.....	33
2.5 Isolamento dos neutrófilos.....	34
2.6 Avaliação do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos.....	34
2.7 Análise estatística.....	35
3 Resultados.....	35
3.1 Estresse oxidativo sistêmico em cães obesos.....	36
3.2 Desequilíbrio na produção de leptina e adiponectina na obesidade canina.....	38
3.3 Ativação do metabolismo oxidativo e viabilidade dos neutrófilos em cães obesos.....	38

3.4 Relação entre a hiperleptinemia, a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e o estresse oxidativo sistêmico em cães.....	40
4 Discussão.....	42
5 Conclusão.....	45
6 Agradecimentos.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

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 hydroethidine 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.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Contextualização do problema

A obesidade é frequente na rotina da clínica de pequenos animais. É uma doença nutricional caracterizada por acúmulo excessivo de tecido adiposo. Estudos já observaram que cerca de 40% da população canina mundial está em sobrepeso ou com obesidade. A obesidade está ligada a diversas condições de saúde, como resistência à insulina, pancreatite, doenças ortopédicas, doenças renais, neoplasias, osteoartrite, hiperleptinemia e diminuição da expectativa de vida. A relação entre o estresse oxidativo e seus efeitos deletérios na resposta imune de pacientes obesos está bem estabelecida em humanos, porém na espécie canina pouco se sabe sobre o efeito da obesidade no estresse oxidativo sistêmico e sua relação com o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Em humanos, a principal hipótese é que os neutrófilos circulantes são ativados em indivíduos com obesidade grave, sendo que os neutrófilos possuem meia vida curta, indicando que a condição inflamatória crônica associada com obesidade é caracterizada por uma ativação contínua do sistema imune inato. O tecido adiposo secreta uma gama de substâncias biologicamente ativas denominadas adipocinas, como adiponectina e leptina. A leptina é uma proteína sintetizada principalmente por adipócitos e sabe-se que cães obesos apresentam um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de leptina. Em humanos, já se sabe que o receptor de leptina está presente em neutrófilos sendo capaz de influenciar sua ativação e também favorecer o quadro de estresse oxidativo. Portanto, torna-se essencial investigar a relação da obesidade canina com a função neutrofílica e associar com a hiperleptinemia, orientando novas estratégias de tratamentos para controlar os efeitos indesejáveis do estresse oxidativo.

2 Pesquisa bibliográfica

Foi realizada uma revisão sistemática com o objetivo de testar a hipótese de que em cães obesos ocorre uma ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e teve como base estudos publicado no período de 2007 a 2017. A busca na literatura foi conduzida na base de dado eletrônico: MEDLINE (acessada pelo Pubmed). A estratégia de busca foi composta por descritores para indexação de artigos relacionados à população (indivíduos obesos) e à intervenção de interesse (metabolismo oxidativo dos neutrófilos), com a utilização dos booleanos AND e OR. Não foi utilizado limite de busca quanto a espécie e a busca se limitou aos artigos escritos em inglês.

A pergunta foi baseada no critério PICO (STILLWELL et al., 2010): Em cães obesos ocorre ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos? e geraram as seguintes estratégias de busca: (*Obese or obesity [Title] AND Metabolism oxidative neutrophils or polymorphonuclear [MeSH Terms]*) e (*obese[Title] AND neutrophil[Title]*) resultando em 47 artigos, após leitura dos resumos foram selecionados somente dois trabalho em humanos. Devido à escassez de artigos, a revisão foi expandida para outros bancos de dados (Portal da Pesquisa e Google Acadêmico) utilizando também a seguinte estratégia (*Weight gain OR obese AND Immunity OR neutrophil AND dog*) selecionando um trabalho na espécie canina e foi ampliada a pesquisa com a estratégia de busca (*obese OR obesity AND neutrophils*) selecionando um trabalho em rato. Além disso, foi realizada uma revisão nas referências dos artigos selecionados, localizando mais um trabalho em humanos. O período da pesquisa bibliográfica se estendeu até o dia 15/06/2017.

3 Revisão Sistemática da literatura

Foram selecionados cinco trabalhos, como critério de seleção utilizou-se apenas estudos que avaliaram efeito da obesidade sobre metabolismo oxidativo dos neutrófilos, a maior porcentagem dos trabalhos localizados foi realizada na espécie humana (n=3). Foram encontrados principalmente

estudos experimentais (n=4) sendo somente um randomizado (Quadro 1). Na espécie canina, foi localizado um trabalho experimental randomizado.

Quadro 1- Metodologias e principais resultados de estudos sobre o efeito da obesidade no metabolismo oxidativo dos neutrófilos

Autores	Tipo de estudo	Espécie (n)	Tratamento	Método de Análise	Efeito no metabolismo oxidativo
Trottier et al. (2012)	Experimental	Humanos Grupos <u>Controle</u> IMC 20-25 (n=9) <u>Obesos</u> IMC 37.5–63.7 (n=30)		Determinada pela redução do ferricitocromo C Estímulo: *PMA (0,01 µmol/L, 0,1 µmol/L e 1 µmol/L) *Incubado a 37°C por 30 min	Sem estímulo: maior produção de superóxido no grupo obeso (IMC 37.5–63.7) PMA (0,01 µmol/L e 1 µmol/L): Menor produção de superóxido nos pacientes com IMC 50-63,7
Van de Velde et al. (2012)	Experimental randomizado	Canina (n=16) Grupos: <u>Controle</u> *ECC 3,03±0,87 (n=8) <u>**Ganho de peso</u> ECC 3,91±0,63 (n=8) *Escala de 5 pontos **13 semanas dieta de alta gordura e proteína		Quimiluminescência Estímulo: PMA (50µg/mL, 20µg/mL e 10µg/mL)	Não houve diferença entre os grupos

PMA: Acetato miristato de forbol; IMC: Índice de massa corporal; ECC: Escore de condição corporal; fMLP: N-formyl-methionine-leucine- phenylalanine; DCFH: sonda diacetato de diclorofluoresceína; HE: sonda hidroetidina.

Quadro 1- (continuação) Metodologias e principais resultados de estudos sobre o efeito da obesidade no metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Autores	Tipo de estudo	Espécie (N)	Tratamento	Método de Análise	Efeito no metabolismo oxidativo
Albuquerque et al. (2016)	Clínico não-randomizado	Ratos wistar Grupos: <u>Controle</u> (n=5) <u>*Obeso</u> (n=5) <u>Chá verde</u> (n=5) <u>Obeso+ Chá verde</u> (n=5) *Dieta de cafeteria por 8 semanas	Chá verde Dose: 500mg/kg Tempo: 60 dias	Espectrofotometria Sondas: HE (5 µM) DCFH (5 µM) Estímulo: *PMA (20ng) *15min de incubação	Superóxido <i>Sem estímulo:</i> Não houve diferença <i>PMA:</i> Grupo obeso: aumentou Obeso + Chá Verde = aumentou Peróxido de hidrogênio <i>Sem estímulo:</i> Não houve diferença <i>PMA</i> Grupo Obeso: diminuiu Obeso + Chá Verde: diminuiu
Zieliska-Przyjemka et al. (2009)	Experimental	Humanos Grupos: <u>Saudável</u> IMC: 22,1±1,6 (n=15) <u>Obeso</u> IMC=34±4,9 (n=9)	Os neutrófilos foram incubados com o sobrenadante do suco e chips de beterraba Concentrações: 0,1-10% (incubado por 30 min a 37°C)	Citometria de fluxo Sonda: DCFH Estímulo: *PMA (1µM) *incubado por 10min	<i>Sem estímulo:</i> Não houve diferença <i>PMA:</i> Grupo obeso: maior produção de ERO em relação ao controle O suco e chips de beterraba diminuíram o metabolismo oxidativo dos neutrófilos no grupo saudável e obeso na concentração de 10%
Brotfain et al. (2015)	Experimental	Humanos Grupos: <u>Controle</u> IMC:9-24 (n=14) <u>Obeso</u> IMC:35-69 (n=18)		Determinada pela redução do Ferricitocromo C Estímulo: PMA (50ng/mL) Zymosan (1mg/mL) fMLP	<i>Sem estímulo:</i> Aumentou a produção superóxido no grupo obeso <i>Estimulado:</i> Zymosan e fMLP: aumento da produção de superóxido no grupo obeso PMA: sem diferença entre os grupos

A obesidade está associada a um estado de inflamação crônica e é atualmente a doença nutricional mais encontrada em humanos (FLEGAL et al., 2016) e cães (ZORAN, 2010). Humanos com obesidade mórbida possuem um fator de risco maior para infecção (KARLSSON; BECK, 2010). Os neutrófilos integram a primeira linha de defesa do organismo (KAUFMANN, 2008), possuem uma meia vida curta e quando ativados produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO), que exercem importantes funções microbidas (ARAZNA et al., 2013). Existem três fenótipos de neutrófilos: os quiescentes, pré-ativados e ativados. Os neutrófilos quiescentes não expressam receptores de membrana e não alteram sua morfologia. Os neutrófilos pré-ativados ou *primed* são células prontas por expressarem moléculas de adesão e alterar sua morfologia para realizar diapedese, no entanto, diferem dos neutrófilos ativados por produzirem poucas ERO e por poderem retornar ao estágio quiescente (SWAIN et al., 2002). Para evitar a produção excessiva de ERO e lesões oxidativas, os neutrófilos entram em apoptose em um curto período de tempo após ativação (DUPRÉ-CROCHET et al., 2013) e as ERO também são controladas pelas defesas antioxidantes endógenas e exógenas (HALLIWELL, 2011).

Podem ser empregadas diferentes metodologias para avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, durante a revisão sistemática foram encontrados: método de ferrocitocromo C, quimioluminescência e citometria de fluxo. A maioria desses métodos mensuram as espécies reativas de oxigênio, como o superóxido e peróxido de hidrogênio, que são rapidamente liberados pelos neutrófilos ativados para realizar a fagocitose dos patógenos (CHEN; JUNGER, 2012). Recentemente, a citometria de fluxo vem sendo a metodologia mais utilizada para quantificar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, sendo um método mais sensível e capaz de mensurar rapidamente a atividade de milhares de neutrófilos, utilizando pequena quantidade de sangue ou neutrófilos isolados (ELBIN; LIZARD, 2009).

Os resultados encontrados na revisão sustentam a hipótese de que ocorra uma ativação do metabolismo oxidativo em indivíduos obesos, já que a

maioria dos autores (Quadro 1) observaram uma ativação dos neutrófilos durante a obesidade na presença (n=3) ou ausência de estímulo (n=2). No entanto, utilizando a metodologia baseada na redução do ferrocitocromo C, dois autores encontraram resultados discordantes na prova estimulada, Trottier et al. (2012) observaram menor produção de superóxido em humanos obesos com IMC (índice de massa corporal) entre 50-63,7 e Brotfain et al. (2015) observaram maior produção de superóxido pelos neutrófilos no grupo obeso com IMC entre 35-69. O que poderia explicar tal fato é o tipo e a concentração do estímulo utilizado por cada autor, já que o grau de obesidade era similar entre os estudos.

Existem vários agentes estimuladores de neutrófilos, como por exemplo, o formil peptídeo met-leu-phe (fMLP), lipopolissacarídeo (LPS), fator de agregação plaquetária (PAF), zymosan e o acetato miristato de forbol (PMA) (EI-BENNA et al., 2008). O PMA é o mais utilizado como controle positivo de ativação de neutrófilos em experimentos *in vitro*. Esse agente atravessa a membrana plasmática ativando diretamente a proteína quinase C e pode induzir uma grande liberação de ERO (YAMAZAKI et al., 2011).

Nos trabalhos encontrados durante a revisão sistemática, todos os autores optaram pelo estímulo com PMA e somente dois estudos observaram ativação dos neutrófilos durante a obesidade com estímulo de PMA (ALBUQUERQUE et al., 2016; ZIELISKA-PRZYJEMSKA et al., 2009). A produção de superóxido não foi afetada na presença do PMA com concentração de 50 ng/mL (BROTFAIN et al., 2015). No mesmo estudo, uma maior produção superóxido foi observada em indivíduos obesos utilizando outros dois estímulos (fMLP e zymosan) que são considerados estímulos fisiológicos. Já Trottier et al. (2012) relataram baixa produção de superóxido por neutrófilos estimulados por PMA (0,01 $\mu\text{mol/L}$ e 1 $\mu\text{mol/L}$), porém o estudo sugere que essa inibição não teria impacto significativo sobre a defesa imunológica dos indivíduos obesos, já que as outras funções dos neutrófilos avaliadas (quimiotaxia e atividade fagocítica) não foram alteradas.

O único trabalho com a espécie canina localizado durante a revisão sistemática (VAN DE VELDE et al., 2012) utilizou protocolo para induzir a obesidade em um curto período de tempo (13 semanas). O método empregado para avaliar os neutrófilos foi a quimiluminescência dependente de luminol que mensura a produção total de ERO (ALVES et al., 2003). Os autores não observaram diferença entre os grupos controle e ganho de peso. Provavelmente o tempo curto de indução e o grau da obesidade podem ter influenciado nos achados, já que o grupo ganho de peso era composto por animais classificados como obesos em conjunto com animais com sobrepeso.

Foram localizados dois estudos (ALBUQUERQUE et al., 2016; ZIELISKA-PRZYJEMSKA et al., 2009) que avaliaram o uso de antioxidantes durante obesidade para prevenir a produção excessiva de ERO pelos neutrófilos. Um estudo realizado *in vitro* em humanos obesos avaliou o efeito do uso de subprodutos à base de beterraba no metabolismo oxidativo (ZIELISKA-PRZYJEMSKA et al., 2009). Os neutrófilos isolados de indivíduos obesos tinham produção de ERO significativamente maior em comparação com neutrófilos de pessoas não obesas. Quando os neutrófilos foram incubados com o sobrenadante do suco ou chips de beterraba ocorreu uma diminuição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos no grupo obeso de forma dependente da concentração utilizada do antioxidante e o suco de beterraba se mostrou mais efetivo.

Foi localizado um trabalho clínico não randomizado que observou maior produção de superóxido em neutrófilos de ratos obesos (ALBUQUERQUE et al., 2016). Esses animais foram tratados com chá verde e era esperado que ocorresse redução da produção de superóxido nos neutrófilos no grupo obeso. No entanto, houve um aumento de superóxido na presença do estímulo com PMA. Os autores sugerem que as catequinas e seus metabólitos, podem ter um efeito pró-oxidante, levando à produção ERO Outro dado interessante observado por Albuquerque et al. (2016) foi a inibição na atividade de superóxido dismutase em ratos tratados com dieta de cafeteria, o que pode explicar o aumento de superóxido e diminuição de peróxido de

hidrogênio (Quadro 1). Esses dados sugerem que a obesidade pode prejudicar a atividade de algumas enzimas antioxidantes e aumentar a disponibilidade de algumas ERO, favorecendo o quadro de estresse oxidativo. Já se sabe que o estresse oxidativo sistêmico compromete a função celular e participa na patogenia de inúmeras doenças em humanos (REUTER et al., 2010) e cães (ALMEIDA et al., 2013; BOSCO et al., 2017).

Durante a revisão sistemática, observamos relação entre hiperleptinemia e a obesidade (ALBUQUERQUE et al., 2016; VAN DE VELDE et al., 2012) e esses dados geraram a seguinte dúvida: “O aumento da leptina durante a obesidade interfere no metabolismo oxidativo dos neutrófilos?”

O tecido adiposo branco é altamente vascularizado e innervado, composto principalmente de células especializadas chamadas de adipócitos (FRÜHBECK et al., 2001). Recentemente, o tecido adiposo ficou conhecido como um órgão endócrino por produzir inúmeras adipocidocinas, como leptina, fator de necrose tumoral, interleucina-6 e resistina que estão em maior concentração durante a obesidade, enquanto os níveis plasmáticos de adiponectina diminuem (BASTARD et al., 2006). A leptina atua no hipotálamo e desempenha um papel importante na regulação da ingestão de alimentos e gasto energético, pode também estar envolvida em transtornos do sistema imunológico (ABELLA et al., 2017). Em humanos, a deficiência de leptina ou do seu receptor resulta em obesidade severa (ROJANO-RODRIGUEZ et al., 2016) e cães obesos apresentam aumento significativo nas concentrações plasmáticas de leptina (PARK et al., 2014).

O receptor de leptina está presente em neutrófilos e é capaz de influenciar a sua capacidade oxidativa em humanos (CALDEFIE-CHEZET et al., 2001) podendo favorecer o quadro de estresse oxidativo (BLANCA et al., 2016). Estudo *in vitro* utilizando neutrófilos isolados de oito indivíduos saudáveis observou por citometria de fluxo que o metabolismo oxidativo dos neutrófilos é ativado em concentrações de leptina de 250 e 500 ng/mL (CALDEFIE-CHEZET et al., 2003). No entanto, são necessários mais estudos e uma revisão sistemática mais ampla para elucidar o efeito dessa adipocina

sobre a capacidade oxidativa, uma vez que sabe-se muito pouco sobre os mecanismos pelos quais a leptina afeta a função neutrofílica.

Analisando o conjunto de resultados obtido durante a revisão sistemática, a hipótese inicial foi aceita confirmando que os neutrófilos de indivíduos obesos são ativados produzindo maior quantidade de superóxido. Porém foram encontrados somente três trabalhos em humanos e um na espécie canina, na qual a obesidade foi induzida em um curto período de tempo. Isso ressalta a importância de mais estudos sobre o tema, já que a obesidade é uma das enfermidades nutricionais mais rotineiras na clínica veterinária e pode comprometer a saúde do cão, participando de diversas enfermidades (GERMAN, 2006). A hiperleptinemia parece ter estreita relação com a capacidade oxidativa dos neutrófilos e maiores investigações devem ser realizadas.

4 Objetivos

Com base nas evidências obtidas na revisão de literatura sistemática, algumas hipóteses foram formuladas com o objetivo de estabelecer uma melhor relação do estresse oxidativo com a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães obesos e com hiperleptinemia.

Testar a hipótese de que em cães obesos ocorre aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Testar a hipótese de que o aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos está associado ao estresse oxidativo em cães obesos.

Testar a hipótese de que a ativação dos neutrófilos e o estresse oxidativo sistêmico ocorrem em cães com hiperleptinemia.

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

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

Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo FOA- 2014/01343).

2.1 Seleção dos animais

Foram selecionados 76 cães adultos, machos e fêmeas, castrados e não castrados de diferentes raças (Tabela 1). De acordo com o escore de condição corporal (ECC) de Laflamme (1997), o grupo controle foi constituído de 24 cães com ECC 4-5 e considerados clinicamente saudáveis após realização de exame clínico completo e avaliação laboratorial (hemograma completo, concentração plasmática de proteína total, albumina, bilirrubina total, fosfatase alcalina-FA, gama-glutamyltransferase-GGT, ácido úrico, alanina aminotransferase-ALT, aspartato aminotransferase-AST, creatina quinase-CK, ureia, creatinina, cálcio, fósforo, glicose, colesterol total e triglicérides). Outros 25 cães foram categorizados como sobrepeso com ECC 6-7 e 27 como obesos com ECC 8-9. Os animais de todos os grupos realizaram exames clínicos e laboratoriais (Tabela 2). Foram constituídos mais dois subgrupos: cães com e sem hiperleptinemia (obtidos do grupo controle), agrupados conforme o intervalo confiança de 95% obtido dos valores de leptina plasmática do grupo controle. Para tal, foram considerados com hiperleptinemia animais com valores de leptina plasmática superiores a 13,09 ng/mL.

As causas associadas à obesidade canina relatadas por German (2006) foram investigadas, sendo excluídos do estudo todos os cães suspeitos de hiperadrenocorticismos e hipotireoidismo. Também foram excluídos cães soropositivos para leishmaniose visceral canina por ELISA indireto (LIMA et al., 2003) e aqueles que recentemente foram tratados com medicamentos que favorecem a obesidade (acetato de megestrol, cortisona, fenobarbital e primidona), antioxidantes ou que afetam o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (corticosteroides, vacinas, anti-inflamatórios e antibióticos).

TABELA 1- Caracterização dos cães de acordo escore de condição corporal (ECC): Controle (ECC 4-5), sobrepeso (ECC 6-7) e obeso (ECC 8-9).

Características	Controle (n=24)	Sobrepeso (n=25)	Obeso (n=27)
Sexo (%)			
Fêmea	72	68	74,07
Macho	28	32	25,93
Estado Reprodutivo (%)			
Castrado	45,83	48	48,15
Não Castrado	54,17	52	51,85
Faixa etária (%)			
1 - 6 anos	72	65	59,26
> 6 anos	28	55	40,74
Raça (%)			
SRD	50	40	37,04
Poodle	8,33	8	14,81
Labrador	0	12	18,52
Pitt bull	12,5	0	0
Outros	29,17	40	29,63

2.2 Colheita das amostras e análises laboratoriais

Após um jejum alimentar de 8 a 12 horas, 10 mL de sangue total foram colhidos de cada animal por punção da veia jugular, sendo nove mililitros acondicionados em tubos heparinizados estéreis para isolamento dos neutrófilos e obtenção de plasma para análises bioquímicas, do estresse oxidativo e adipocinas. O restante do sangue foi acondicionado em tubo com EDTA-sódico para realização do hemograma.

As análises bioquímicas plasmáticas foram realizadas em espectrofotômetro automatizado (BS 200, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China) previamente calibrado com calibrador e soros controles níveis I e II e utilizando reagentes comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain). Foi determinado o teor de ureia (método enzimático UV urease/glutamato desidrogenase); fosfatase alcalina (método dietanolamina), GGT (método enzimático UV urease/glutamato desidrogenase), creatinina (método cinético do picrato alcalino); albumina (método do verde de

bromocresol); colesterol total (método enzimático oxidase/peroxidase); triglicerídeos (método enzimático glicerol fosfato oxidase/peroxidase); bilirrubina total (método sulfanílico diazotado); ácido úrico (método enzimático uricase/peroxidase); cálcio total (método colorimétrico da cresolftaleína complexona), AST e ALT (método cinético IFCC). Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C conforme orientações dos fabricantes.

O hemograma foi realizado em contador automatizado de células veterinário (BC-2800Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corados com corante hematológico panótico rápido comercial (Instant-Prov, Newprov, Pinhais-PR).

2.3 Determinação do estresse oxidativo plasmático

A capacidade antioxidante total (TAC) foi determinada pelo método descrito por Erel (2004) e os resultados expressos em μmol de equivalente de Trolox/L. A capacidade oxidante total (TOC) foi quantificada pelo método descrito por Erel (2005) e os resultados expressos em μmol de peróxido de hidrogênio equivalente/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 foi determinada pela quantificação das espécies reativas ao tiobarbitúrico (TBARS) segundo método de Hunter et al. (1985), com auxílio da leitora automática de microplacas (Robonik, Elisa Plate Analyser, India) e absorvância medida em 540 nm

2.4 Determinação das adipocinas plasmáticas

As concentrações de adiponectina (Cloud-clone corp, Houston, TX, USA) e leptina (Millipore Corp., St. Charles, Missouri, USA) foram determinadas utilizando-se reagentes comerciais por ELISA espécie-específico com auxílio de uma leitora automática de microplacas de 96 poços (Robonik, Elisa Plate Analyser, India) e absorvância medida em 450 nm.

2.5 Isolamento dos neutrófilos

Os neutrófilos foram isolados do sangue total heparinizado conforme protocolo descrito por Bosco et al. (2017). Resumidamente, quatro mililitros de sangue heparinizado foram utilizados para o isolamento dos neutrófilos em duplo gradiente de separação contendo 3 mL de Histopaque-1119[®] e 3 mL de Histopaque-1070[®] (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). As células isoladas foram então lavadas duas vezes com solução aquosa de cloreto de amônio (0,14 mol/L) e uma vez com Solução Salina Balanceada de Hanks (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). Após contagem em hemocitômetro, as células foram diluídas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) na concentração 10⁶/mL. A viabilidade foi estimada pelo método de exclusão do azul de tripan e a pureza foi determinada por citologia. Apenas os isolamentos que obtiveram viabilidade e pureza acima de 95 e 93%, respectivamente, foram incluídos no estudo.

2.6 Avaliação do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos

A avaliação do metabolismo oxidativo e apoptose dos neutrófilos seguiu metodologia previamente descrita (BOSCO et al., 2017). Resumidamente, os neutrófilos isolados foram incubados com a sonda hidroetidina (HE) (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) 10 µM para avaliar a produção de superóxido e para a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio, utilizou-se a sonda diacetato de diclorofluoresceína (DCFH) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) 5 µM, ambos com e sem o estímulo de 0,55 µM de acetato miristato de forbol (PMA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) a 37°C por 10 minutos. A fluorescência média vermelha para superóxido e verde para peróxido de hidrogênio foi quantificada em um citômetro de fluxo capilar (BD Accuri C5 Flow Cytometer, San Diego, CA, USA) com aquisição de 10.000 eventos dentro da população de células característica dos neutrófilos, demonstrando maior complexidade e tamanho. Para avaliação da viabilidade e a apoptose total (apoptose inicial + apoptose final), foi utilizado o sistema Anexina V-PE (Guava Nexin Kit, Guava

Technologies, USA), seguindo as recomendações do fabricante com aquisição de 10.000 eventos também no mesmo citômetro de fluxo capilar.

2.7 Análise estatística

Todas as variáveis foram testadas quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste Bartlett). Para determinar a significância das diferenças entre os grupos foi realizado o teste de ANOVA e o pós-teste de Tukey para variáveis paramétricas e Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn para variáveis não paramétricas. Para determinação do grau de correlação, foi utilizado o coeficiente de Spearman. Os animais com e sem hiperleptinemia foram agrupados conforme o intervalo confiança de 95% obtido dos valores do grupo controle. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças com $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism (GraphPad software, versão 5.01, 2007). O poder do teste foi obtido utilizando programa computacional OpenEpi, v. 3.01 (Copyright 2003, 2008 Andrew G. Dean; Kevin M. Sullivan, Atlanta, GA, USA, 2006).

3 Resultados

Foram observados no grupo controle valores do hemograma e do perfil bioquímico dentro da normalidade, enquanto cães obesos apresentaram maior concentração plasmática de triglicédeos, ácido úrico e da atividade de FA e ALT (Tabela 2). Tais alterações não ocorreram nos cães com sobrepeso, exceto ao hiperurecemia que foi igualmente significativa (Tabela 2).

TABELA 2 – Parâmetros hematológicos e bioquímicos plasmáticos (média e desvio-padrão) de cães de acordo com o escore de condição corporal (ECC): Controle (ECC 4-5), sobrepeso (ECC 6-7) e obeso (ECC 8-9).

Exames laboratoriais	Controle (n=24)	Sobrepeso (n=25)	Obeso (n=27)	p-valor
Hemograma				
Volume globular (%)	49,53 ± 4,5 ^a	48,91 ± 6,57 ^a	49,56 ± 5,86 ^a	0,9770 [#]
Hemácias (10 ⁶ /L)	6,76 ± 0,6 ^a	6,95 ± 0,82 ^a	6,81 ± 0,73 ^a	0,1409 [#]
Hemoglobina (g/dL)	16,96 ± 1,5 ^a	17,76 ± 2,15 ^a	17,53 ± 2,06 ^a	0,1343 [#]
VCM (fL)	73,25 ± 1,9 ^a	72,73 ± 2,62 ^a	72,51 ± 2,88 ^a	0,3840 [#]
CHCM (%)	34,17 ± 1,0 ^a	34,48 ± 2,47 ^a	34,95 ± 2,16 ^a	0,2376 [#]
Leucócitos totais (10 ³ /L)	10,68 ± 3,9 ^a	10,35 ± 3,29 ^a	11,79 ± 3,66 ^a	0,4546 [#]
Bioquímica plasmática				
Ácido úrico (mmol/L)	0,03 ± 0,04 ^a	0,05 ± 0,04 ^b	0,05 ± 0,07 ^b	0,0163 [#]
ALT (UI/L)	35,73 ± 11,7 ^a	48,33 ± 37,01 ^{ab}	49,79 ± 22,75 ^b	0,0492 [#]
AST (UI/L)	28,03 ± 9,1 ^a	27,39 ± 10,30 ^a	28,58 ± 8,80 ^a	0,6559 [#]
Colesterol (mmol/L)	5,37 ± 2,01 ^a	4,39 ± 1,27 ^a	5,61 ± 1,50 ^a	0,0651 [#]
Creatinina (umol/L)	5,01 ± 0,79 ^a	4,99 ± 0,81 ^a	5,16 ± 0,82 ^a	0,3142 [#]
Glicose (mmol/L)	90,26 ± 14,2 ^a	89,99 ± 14,60 ^a	92,92 ± 14,80 ^a	0,7587 [#]
Ureia (mmol/L)	6,16 ± 1,25 ^a	5,17 ± 1,53 ^a	5,49 ± 1,83 ^a	0,1085 [#]
FA (UI/L)	39,87 ± 27,8 ^a	50,94 ± 49,95 ^{ab}	59,62 ± 37,12 ^b	0,0349 [#]
Triglicérides (mmol/L)	0,64 ± 0,24 ^a	1,12 ± 0,77 ^{ab}	1,45 ± 1,27 ^b	0,0008 [#]
Cálcio (mmol/L)	2,38 ± 0,23 ^a	2,32 ± 0,33 ^a	2,50 ± 0,30 ^a	0,0939 [#]
Albumina (g/L)	31,12 ± 3,8 ^a	29,85 ± 5,41 ^a	32,88 ± 4,62 ^a	0,0859 [#]
Bilirrubina total (umol/L)	11,46 ± 1,71 ^a	11,80 ± 4,46 ^a	12,65 ± 6,33 ^a	0,6928 [#]
GGT (UI/L)	3,55 ± 1,5 ^a	4,10 ± 2,40 ^a	3,76 ± 2,26 ^a	0,8736 [#]

Letras distintas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo [#] teste ANOVA com o pós-teste de Tukey ou [#] Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn.

3.1 Estresse oxidativo sistêmico em cães obesos

A peroxidação lipídica ($7,05 \pm 4,90$ vs. $11,96 \pm 6,40$ $\mu\text{mol/L}$, $p=0,0142$), a capacidade oxidante total ($102,1 \pm 41,78$ vs. $178,0 \pm 68,24$ $\mu\text{mol/L}$, $p=0,0017$) e o IEO ($13,59 \pm 8,16$ vs. $25,47 \pm 14,89\%$, $p=0,0036$) foram maiores em cães

obesos em relação aos cães controle (Figura 1), no entanto, não foi observada alteração da capacidade antioxidante total no grupo obeso em relação aos cães com escore corporal normal ($0,92\pm 0,19$ vs. $0,85\pm 0,17$ mmol/L, $p=0,1090$) (Figura 1).

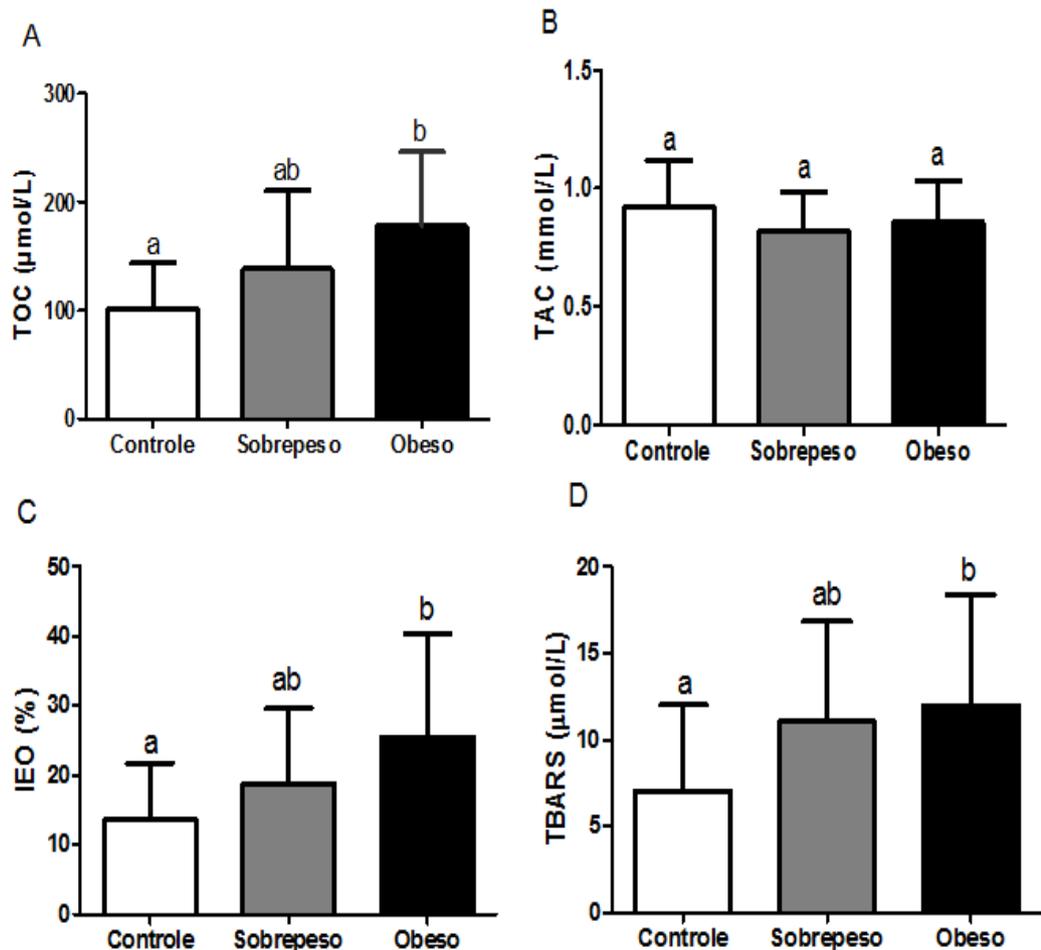


FIGURA 1- Concentração plasmática dos marcadores de estresse oxidativo: Concentração oxidante total (TOC, **A**/1- $\beta=99,83$), Capacidade antioxidante total (TAC, **B**), índice de estresse oxidativo (IEO, **C**/ 1- $\beta=85,14$) e Peroxidação lipídica determinada pela substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, **D**/ 1- $\beta=80,75$) de cães segundo escore de condição corporal (ECC): controle (ECC 4-5, n=24), sobrepeso (ECC 6-7, n=24) e obesos (ECC 8-9, n=27). Os gráficos são representados por média e desvio-padrão. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) pelo teste ANOVA com o pós-teste de Tukey (A e B) e Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn (C e D).

3.2 Desequilíbrio na produção de leptina e adiponectina na obesidade canina

Os cães obesos apresentaram maior concentração da leptina plasmática que cães controle ($27,45 \pm 27,72$ vs. $9,79 \pm 6,62$ ng/mL, $p=0,0144$), enquanto que os cães com sobrepeso não apresentaram diferença significativa ($15,43 \pm 11,88$ vs. $9,8 \pm 6,6$ ng/mL) (Figura 2). Houve uma correlação positiva da leptina com o ECC ($r= 0,4597$; $p=0,0004$).

Os valores médios de adiponectina plasmática dos cães obesos foram menores que os dos cães controle ($11,79 \pm 6,40$ vs. $10,27 \pm 2,86$ pg/mL), porém tal diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,7607$) (Figura 2).

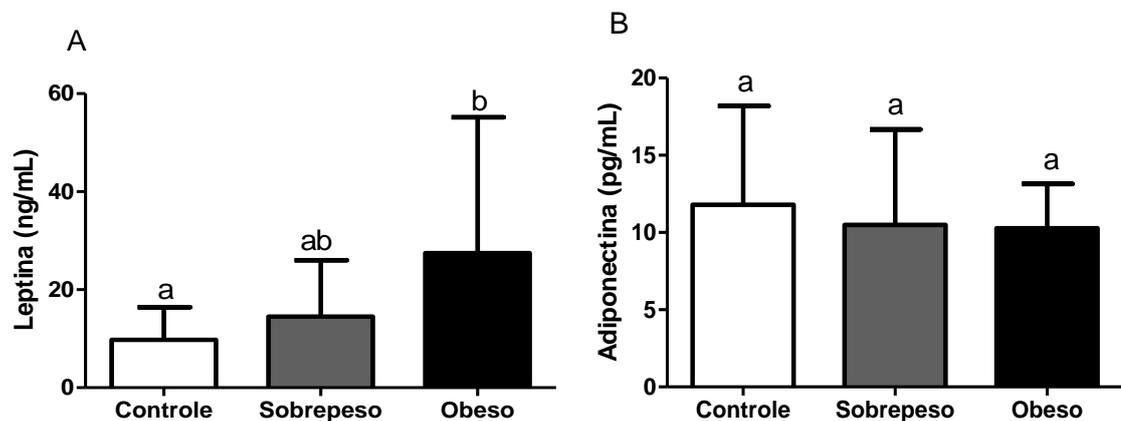


FIGURA 2 - Concentração plasmática de leptina (**A**) ($1-\beta=78,95$) e adiponectina (**B**) de cães segundo escore de condição corporal (ECC): controle (ECC 4-5, $n=17$), sobrepeso (ECC 6-7, $n=19$) e obesos (ECC 8-9, $n=19$). Os gráficos são representados por média e desvio-padrão. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) pelo teste Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn.

3.3 Ativação do metabolismo oxidativo e viabilidade dos neutrófilos em cães obesos

A produção espontânea de superóxido de cães obesos ($14,48 \pm 3,31$) e com sobrepeso ($15,45 \pm 5,16$) não diferiu ($p=0,3670$) dos cães com escore corporal normal ($13,79 \pm 3,78$). No entanto, sob estímulo do PMA, a produção média de superóxido nos neutrófilos de cães obesos ($215,62 \pm 63,87$) foi maior ($p=0,0349$) que a dos cães controle ($173,8 \pm 53,01$). Foi observada correlação

positiva entre a produção de superóxido estimulada pelo PMA com o ECC ($r=0,2745$; $p=0,0164$).

Já a média da produção espontânea de peróxido de hidrogênio em neutrófilos de cães obesos ($18,78\pm 16,22$), sobrepesos ($18,56\pm 11,28$) e controle ($18,25\pm 8,33$) não diferiram significativamente ($p=0,6864$). Na presença do estímulo com PMA (Figura 3), tal diferença também não foi significativa ($p=0,3870$) entre cães obesos ($61,31\pm 28,39$), sobrepeso ($52,49\pm 19,89$) e com escore corporal normal ($48,91\pm 18,84$) (Figura 3).

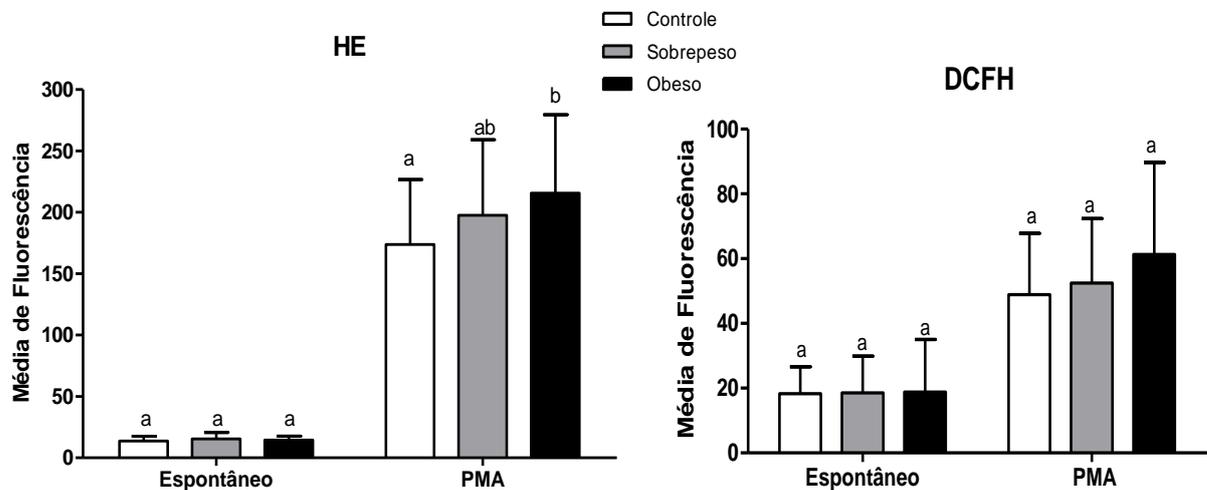


FIGURA 3 - Produção neutrofílica de superóxido quantificada pela sonda hidroetidina (HE) e de peróxido de hidrogênio quantificada pela sonda diacetato de diclorofluoresceína (DCFH) em citometria de fluxo capilar de cães segundo escore de condição corporal (ECC): controle (ECC 4-5, $n=24$), sobrepeso (ECC 6-7, $n=24$) e obesos (ECC 8-9, $n=27$) na ausência (espontâneo) e presença de estímulo com acetato miristato de forbol (PMA). Os gráficos são representados por média e desvio-padrão. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) pelo teste Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn. Sonda HE na presença de PMA: $1-\beta=100$.

Os cães obesos apresentaram menor viabilidade e maior apoptose dos neutrófilos que cães com escore corporal normal (Tabela 3). Tais diferenças não foram observadas na presença do indutor CAM (Tabela 3).

TABELA 3 - Viabilidade e taxa de apoptose total (média e desvio-padrão) dos neutrófilos de cães na ausência (NE) e na presença do indutor camptotecina (CAM) de acordo com escore de condição corporal (ECC): controle (ECC 4-5, n=24), sobrepeso (ECC 6-7, n=24) e obesos (ECC 8-9, n=27).

Parâmetro	Controle	Sobrepeso	Obeso	p-valor
*Viabilidade NE (%)	98,82 ± 0,57 ^a	98,49 ± 0,94 ^{ab}	98,01 ± 1,39 ^b	0,0289
Viabilidade CAM (%)	79,52 ± 6,46 ^a	80,85 ± 7,36 ^a	79,64 ± 8,36 ^a	0,5633
*Apoptose total NE (%)	0,62 ± 0,34 ^a	0,87 ± 0,72 ^{ab}	1,34 ± 1,14 ^b	0,0094
Apoptose total CAM (%)	18,59 ± 8,04 ^a	16,41 ± 7,20 ^a	19,54 ± 8,28 ^a	0,4363

Letras distintas indicam diferença estatística significativa pelo teste Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn. * 1-β=79,3 **1-β=87,88

3.4 Relação entre a hiperleptinemia, a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e o estresse oxidativo sistêmico em cães

A hiperleptinemia (>13,09 ng/mL) ocorreu em 44,44% dos cães com sobrepeso e em 73,70% dos cães obesos. A produção neutrofílica espontânea de superóxido não foi significativamente maior em cães com hiperleptinemia (14,92±3,94 vs. 15,20±2,93, p=0,8026). No entanto, após a ativação com PMA, cães com hiperleptinemia apresentaram um aumento significativo (159,50±46,00 vs. 216,30±70,13, p=0,0094) na produção de superóxido (Figura 4). Além disso, considerando o ECC de todos os animais houve correlação positiva entre a leptina e a produção de superóxido estimulada com PMA (r=0,2990, p=0,0226).

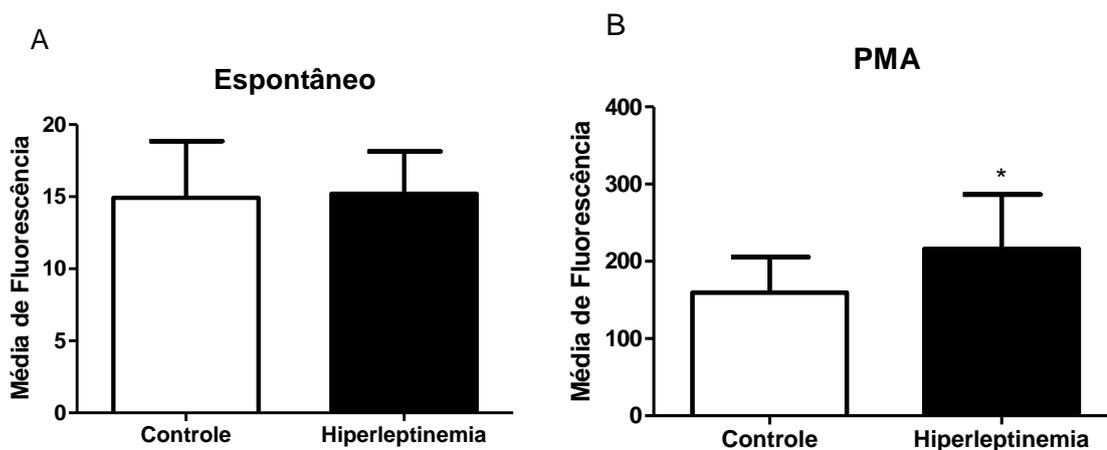


FIGURA 4 - Produção neutrofílica de superóxido quantificada pela sonda hidroetidina (HE) com e sem o estímulo de PMA em cães com níveis normais (controle, n=15) e aumentados de leptina (hiperleptinemia, n=20). Os gráficos são representados por média e desvio-padrão. (*) Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) pelo teste t não pareado.

Em cães com hiperleptinemia observamos uma maior TOC ($97,16 \pm 45,49$ vs. $155,70 \pm 64,92$ $\mu\text{mol/L}$, $p = 0,0070$), IEO ($11,24 \pm 5,27$ vs. $20,23 \pm 12,19\%$, $p = 0,0114$) e peroxidação lipídica ($6,08 \pm 3,63$ vs. $10,13 \pm 5,57$ $\mu\text{mol/L}$, $p = 0,0228$) que em cães controle. Não houve alteração da TAC ($0,89 \pm 0,20$ vs. $0,87 \pm 0,19$ mmol/L , $p = 0,8170$) (Figura 5). A leptina plasmática também apresentou correlação positiva com a TOC ($r = 0,3314$, $p = 0,0451$), IEO ($r = 0,3684$, $p = 0,042$) e peroxidação lipídica ($r = 0,3543$, $p = 0,0398$).

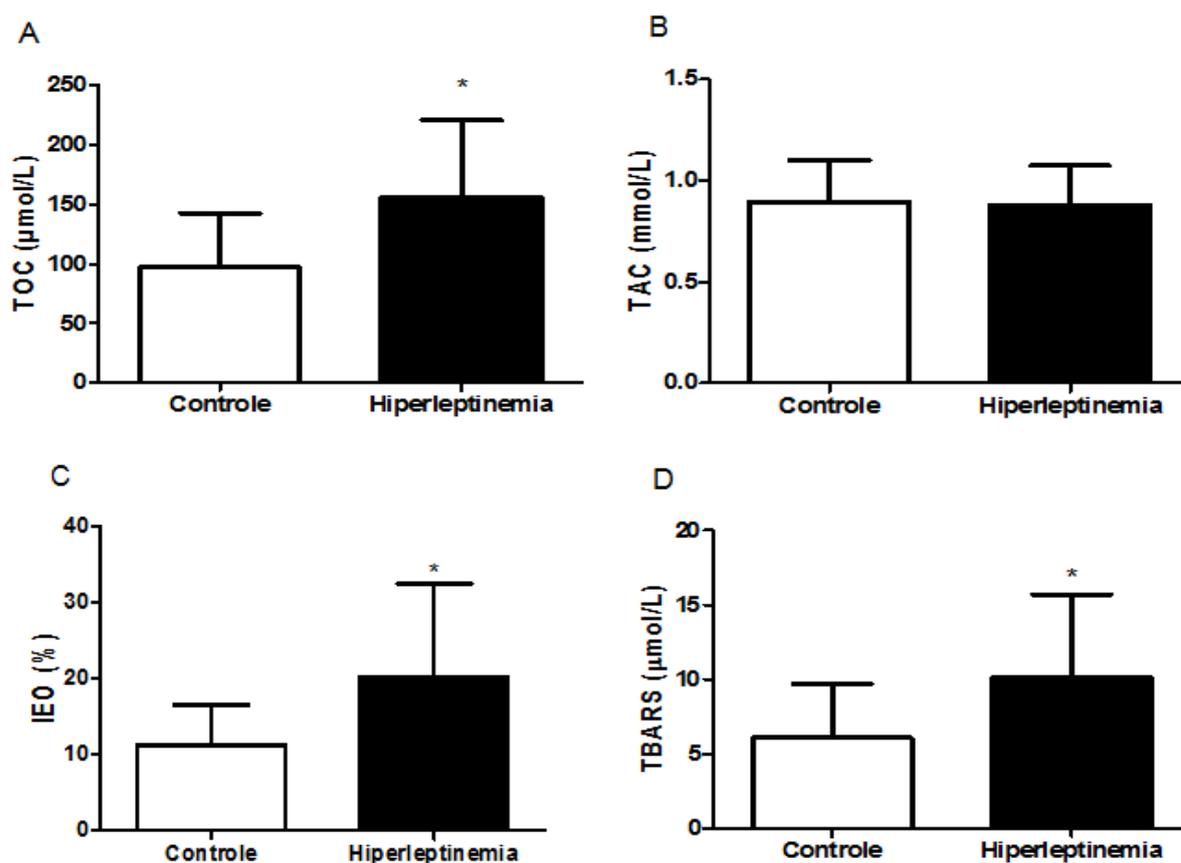


FIGURA 5 - Concentração plasmática dos marcadores de estresse oxidativo: Capacidade oxidante total (TOC, **A**/1-β=89,91), Capacidade antioxidante total (TAC, **B**), índice de estresse oxidativo (IEO, **C**/ 1-β=78,43) e Peroxidação lipídica determinada pela substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, **D**/ 1-β=79,29) de cães com níveis normais (controle, n=15) e aumentados de leptina (hiperleptinemia, n=20). Os gráficos são representados por média e desvio-padrão. (*) Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) pelo teste t não pareado (B e C) ou pelo teste Mann Whitney (A e D).

4 Discussão

Os exames hematológicos e bioquímicos de cães do grupo controle (Tabela 1) corresponderam aos valores de normalidade da espécie (THRALL, 2007). As alterações laboratoriais (aumento do FA, ALT e triglicerídeos) observados nos cães obesos foram similares aos descritos em outros estudos (RAFAJ et al., 2016; TRIBUDDHARATANA et al., 2011).

A concentração de leptina plasmática (LP) é considerada um índice não subjetivo de adiposidade de cães independente da idade e raça (ISHIOKA et

al., 2002), e tem correlação direta com ECC (PARK et al., 2014). A LP é considerada uma adipocina pró-inflamatória (PAZ-FILHO et al., 2012), porém falta um melhor entendimento de como o acúmulo de gordura corporal por si só aumenta as espécies reativas de oxigênio (ERO) e qual a contribuição da hiperleptinemia nesta condição.

Em humanos, a hiperleptinemia tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo sistêmico (EOS) (BLANCA et al., 2016). Neste sentido, nós quantificamos marcadores de EOS em cães com diferentes ECC. Valores maiores de TOC, peroxidação lipídica e IEO permitiram confirmar o EOS em cães obesos. Os valores intermediários desses marcadores nos cães com sobrepeso sugerem que o EOS é progressivo e dependente do tempo de exposição ao aumento da adiposidade corporal.

O ácido úrico é responsável por 60% da capacidade antioxidante total do plasma humano (RUBIO et al., 2016). O aumento do ácido úrico relatado na obesidade humana (ABDUL-MAJEED, 2009) e em roedores (TSUSHIMA et al., 2013) também ocorreu nos cães obesos, provavelmente esta maior concentração de ácido úrico contribuiu para manter a TAC dentro da normalidade, porém não foi insuficiente para evitar o EOS nos cães obesos.

A peroxidação lipídica foi estimada pela concentração plasmática de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que é uma metodologia amplamente empregada para avaliar o EOS (LIU et al., 1997). O aumento da peroxidação lipídica tem sido descrito na obesidade humana (OZATA et al., 2002) e em roedores (BELTOWSKI et al., 2000). Contraditoriamente, o TBARS não aumentou em cães que foram submetidos a regime de engorda num estudo de curta duração (13 semanas) (VAN DE VELDE et al., 2012). Assim como já relatado em outras espécies, a maior peroxidação lipídica do plasma dos cães obesos sugere que o EOS possa em longo prazo contribuir para outras alterações sistêmicas associadas à obesidade canina (GERMAN, 2006).

A adiponectina é secretada pelo tecido adiposo e tem efeitos anti-inflamatórios (PARK et al., 2014). Em humanos, via regulação da NADPH oxidase, inibe *in vitro* a geração de superóxido dos neutrófilos (MAGALANG et

al., 2006). A diminuição da adiponectina relatada em cães obesos (PARK et al., 2014), não foi observada no presente estudo. Comparada a adiponectina, a leptina tem ação inversa, ativa o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e potencialmente contribui para o EOS (CALDEFIE-CHEZET et al., 2003). Foi possível evidenciar a correlação positiva entre o grau de obesidade canina, EOS e o aumento de LP, sendo esta provavelmente a primeira evidência de que a hiperleptinemia em cães está associada positivamente ao grau de obesidade e EOS.

Há evidências de que a hiperleptinemia em humanos exerce papel chave na patogênese das complicações associadas à obesidade, incluindo as inflamações crônicas (WISSE, 2004). O mecanismo pelo qual a leptina ativa a produção de ERO ainda não foi totalmente elucidado, já se sabe que a leptina estimula a oxidação mitocondrial de ácidos graxos (KONUKOGLU et al., 2006) e aumenta a expressão das subunidades p67phox / p47phox da NADPH oxidase o que induz a geração de ânions superóxido em células renais (BLANCA et al., 2016), porém pouco se sabe sobre o efeito da LP nos neutrófilos. Estudo *in vitro* observou que o metabolismo oxidativo neutrofílico é ativado em concentrações de leptina de 250 e 500 ng/mL (CALDEFIE-CHEZET et al., 2003).

Os relatos sobre o efeito da obesidade nos neutrófilos ainda são escassos. Em humanos, os neutrófilos aumentam a produção de superóxido na ausência e na presença de ativadores do metabolismo oxidativo como o zymosan e n-formil-metionil-leucil-fenilalanina, sugerindo que a ativação dos neutrófilos pode contribuir com as doenças relacionadas à obesidade (BROTFAIN et al., 2015). No presente estudo, a produção neutrofílica espontânea de superóxido e de peróxido de hidrogênio não diferiu entre os grupos, porém um grande aumento de superóxido em cães obesos ocorreu após o estímulo com PMA, comprovando o estado *primed* desse poliformonuclear, assim como já foi observado em ratos obesos (ALBUQUERQUE et al., 2016). É provável que a leptina promova um estímulo capaz de pré-ativar os neutrófilos dos cães obesos, estes neutrófilos *primed*

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.; 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.; 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.