THIAGO HENRIQUE ANNIBALE VENDRAMINI

**Expressão gênica da resposta imunoinflamatória e status imunológico de
cães obesos e emagrecidos**

Pirassununga

2019

**Expressão gênica da resposta imunoinflamatória e status imunológico de cães
obesos e emagrecidos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3746
FMVZ

Vendramini, Thiago Henrique Annibale
Expressão gênica da resposta imunoinflamatória e status imunológico de cães obesos e emagrecidos / Thiago Henrique Annibale Vendramini. – 2019.
103 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto.

1. Caninos. 2. Citocinas. 3. Emagrecimento. 4. Linfócitos. 5. Obesidade. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Expressão gênica da resposta imunoinflamatória e status imunológico de cães obesos e emagrecidos**" protocolada sob o CEUA nº 4668091214, sob a responsabilidade de **Marcio Antonio Brunetto e equipe; Thiago Henrique Annibale Vendramini** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/04/2018.

We certify that the proposal "**Gene expression of the immunoinflammatory response and immunological status of obese dogs and after weight loss**", utilizing 20 Dogs (males and females), protocol number CEUA 4668091214, under the responsibility of **Marcio Antonio Brunetto and team; Thiago Henrique Annibale Vendramini** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/15/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2017** a **03/2019**

Área: **Nutrição e produção**

animal

Origem: **domiciliados**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 anos**

N: **20**

Linhagem: **várias raças**

Peso: **15,0kg**

Resumo: A obesidade caracteriza-se por um estado de baixo grau de inflamação crônica que, além de resultar em alterações metabólicas promove importantes alterações no organismo animal. O tecido adiposo participa ativamente na inflamação e na imunidade e, diversas células de defesa do organismo podem, portanto, estar envolvidas nas diversidades presentes entre indivíduos obesos e de peso ideal. Estudos nesta linha têm demonstrado alterações das células imunes em humanos e ratos, no entanto, são escassos na literatura informações neste sentido para cães. Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar o perfil de expressão gênica da resposta imunoinflamatória e a linfoproliferação de cães obesos e as possíveis alterações resultantes após o emagrecimento. Serão incluídos dez cães, fêmeas, castradas, de diferentes raças, com idade entre 1 e 8 anos, obesas, com escore de condição corporal (ECC) igual ou superior a 8 e composição corporal determinada pelo método de diluição de isótopos de deutério. Os cães obesos serão incluídos em um programa de perda de peso e passarão a compor um novo grupo experimental, após a perda de 20% do peso inicial. Um terceiro grupo experimental será constituído por oito cães, fêmeas, castradas, idade entre 1 e 8 anos e ECC ideal (4 ou 5).

Local do experimento: UDCH - FZEA/USP

São Paulo, 16 de abril de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VENDRAMINI, T.H.A.

Título: **Expressão gênica da resposta imunoinflamatória e status imunológico de cães obesos e emagrecidos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a realização deste sonho e desta obra aos meus pais, Carlos Alberto Vendramini e Tânia Annibale Vendramini, por todo amor e principalmente por acreditarem num sonho, confiarem em um menino e sonharem com um grande homem, como seu filho.

Aos meus queridos avós, estejam eles torcendo lá com papai do céu ou aqui em terra, em desculpas pela ausência nesta busca por este sonho em outra cidade, mas ao mesmo tempo pela torcida, admiração e amor.

Aos meus amores e companheiros Milena D. Lacerenza e Bóris, pelo amor, dedicação, carinho e companheirismo, com a certeza de maravilhosos momentos sempre e, para sempre juntos com vocês.

À minha irmã Thaís Cristina Annibale Vendramini, pelo carinho e amor, por sempre acreditar em seu irmão, por toda admiração e, pelo desejo da felicidade de uma vida inteira sempre perto de você.

À aqueles que de alguma forma acreditaram em mim, confiaram que eu poderia chegar muito longe e, deram origem e oportunidades para aqui chegar (representados por Marcio A Brunetto e Marcia Mery)

E, com grande gratidão, ao meu melhor amigo peludo, tigrado e de quatro patas, que me fez almejar a medicina veterinária, o qual não pude ajudar e estar presente nos últimos meses de sua vida, muito pelo fato de estar em busca deste sonho, dedico agora, com toda certeza de saudade, carinho, amor e amizade.

*A estes dedico a obra, todo trabalho, e a realização deste sonho
como forma de gratidão por tudo o que fizeram
por toda felicidade e todo amor
e por toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Grandes conquistas sempre acompanharam grandes agradecimentos....

Então...inicialmente agradeço aos meus pais Carlos Alberto Vendramini e Tânia Annibale Vendramini por todo carinho, amor, educação e felicidade, por toda torcida, incentivo e, todo esforço para proporcionarem o caminho e a realização deste sonho. Vocês são a base desta conquista.

Agradeço com todo amor a minha companheira Milena D. Lacerenza por todo carinho, todo incentivo, toda torcida, por todo amor, toda felicidade e por todos os incríveis e maravilhosos momentos propiciados ao seu lado, desde que lhe conheci e, que foram muito importantes na conquista deste sonho. Agradeço ainda a sua família por toda torcida, força e carinho dispensados (aqui representados pelo Sr. Fabio, Marina, Patrícia e Phelipe).

Ao meu melhor amigo e inesquecível companheiro Tigrão, pela felicidade de uma vida inteira ao seu lado, em desculpas por qualquer falha ou falta de carinho e, por todo amor e toda saudade.

Ao meu pacotinho de amor embrulhado em pelos e banha, ao meu maior companheiro, ao meu amor e filho Bóris agradeço por tudo, mas principalmente por me receber com amor, carinho e felicidade todos os dias, sem falhar em nenhum deles.

Agradeço também a minha irmã Thaís Cristina Annibale Vendramini por toda torcida e todo amor que nenhuma distância é capaz de superar. Que sejamos sempre companheiros e, felizes, sempre perto um do outro.

Aos meus amados avós Alfeu Annibale e Neyde Orsini Annibale, agradeço pelo carinho e, pela torcida por um neto, que apesar da distância para conquistar este sonho, nunca se esquecerá do amor, da saudade e da felicidade de estar ao lado de seus queridos avós.

Aos meus avós Julia Etelvina Ramos Vendramini e Virgílio Vendramini, agradeço o amor, fé, a força e a enorme torcida que sei que sempre ocorreram independente se ao meu lado fisicamente ou espiritualmente.

Aos meus tios Ricardo Annibale e Regina Greco Annibale e meus primos, Renato Annibale e Rubens Annibale, agradeço pelo carinho, pelo cuidado, amor e, pela torcida.

Pelo carinho, força e, toda torcida, agradeço também ao grande amigo Heraldo Orsini Junior e sua esposa Rose.

A todos os demais familiares agradeço pela torcida e pelo incentivo.

Agradeço do fundo do meu coração ao professor e amigo Marcio A. Brunetto, pelos ensinamentos, pelo apoio e trabalho, pela felicidade, por acreditar em mim até mesmo quando eu nem imaginava, por me fazer voar muito alto, pela confiança depositada em mim sempre, pela sua orientação e dedicação, pelo carinho, por dar subsídios para execução deste e de outros trabalhos, pelo companheirismo, pela oportunidade de realização deste sonho, mas principalmente por ser reflexo e exemplo de profissional e pessoa. Muito obrigado.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e Departamento de Nutrição e Produção Animal incluindo seus professor e funcionários pela formação e realização desta conquista.

À minha segunda casa, o local que vi e que me viu crescer muito neste período, o local que desejo e sempre farei de tudo para o maior e melhor desenvolvimento possível, o Centro de Pesquisas em Nutrologia de Cães e Gatos (Cepen Pet).

Ao companheiro de projeto, de conversas e, de muito trabalho Henrique Tobaró Macedo, agradeço a ajuda, dedicação, conversas, felicidade e pelo coração enorme que tem.

Da mesma maneira que ao Henrique, agradeço imensamente aos queridos amigos, Rafael, Claudio, Andressa, Larissa, Mariana Perini, Mel, Matheus, Ana, Vivian e Roberta, por toda ajuda, toda amizade, todas as risadas, todo trabalho, todo companheirismo e todos os ótimos momentos ao lado de vocês. Vocês são incríveis e sou extremamente feliz em trabalhar com vocês.

Ao amigo Filipe Zanferari, lembro e agradeço pela responsabilidade de despertar em mim uma vontade cada vez maior em estudar e trabalhar da melhor maneira possível.

A todos os integrantes do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos, agradeço pela contribuição, trabalho e convivência.

Às queridas Simi, Renata, Ana e Lígia, agradeço toda contribuição, todo cuidado que sempre tiveram comigo, toda dedicação e principalmente todo carinho.

À Karina Pfimer e professor Ferrioli, agradeço todo ensinamento e contribuição não apenas no projeto, mas na minha formação.

Aos professores Marcia Mery, Cristiana Massoco e, Julio Balieiro agradeço imensamente. Estes são integrantes da banca não apenas pela qualidade e contribuição que podem realizar, mas em forma de gratidão por serem muito especiais na conquista deste trabalho e sonho; seja ele na confiança e “aposta” de um jovem menino há anos atrás, seja na ajuda e dedicação de cada minuto, seja como inspiração e exemplo de pessoas e profissionais.

A todos os amigos de graduação e de pós-graduação, ou de outras ocasiões pela torcida e amizade.

Ao Acampamento das Corujas e meus amigos ali conquistados, por terem sido tão importantes na formação de caráter e de pessoa que sou.

À Premier Pet, pela confiança de sempre e, pela concessão de auxílio à pesquisa que possibilitou a realização deste estudo. Além disso, pela construção e manutenção do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos da FMVZ/USP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma colaboraram, torceram, incentivaram ou se dedicaram para realização deste trabalho, que na realidade é um grande sonho.

“All our dreams can come true if we have the courage to pursue them.”

Walt Disney

“Thiago, você é meu ídolo. Te amo.”

Carlos A. Vendramini (meu pai)

RESUMO

VENDRAMINI, T.H.A. **Expressão gênica da resposta imunoinflamatória e status imunológico de cães obesos e emagrecidos.** 2019. 103 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A obesidade caracteriza-se pelo baixo grau de inflamação crônica que além de resultar em alterações metabólicas, promove importantes alterações no organismo animal. O tecido adiposo participa ativamente na inflamação e na imunidade e, diversas células de defesa do organismo podem, portanto, estar envolvidas nas diversidades presentes entre indivíduos obesos e de peso ideal. Estudos nesta linha têm demonstrado alterações das células imunes em humanos e ratos, no entanto, são escassos na literatura informações neste sentido para cães. Desta forma, o presente estudo avaliou o perfil de expressão gênica da resposta imunoinflamatória e a linfoproliferação de cães obesos e as possíveis alterações resultantes após o emagrecimento. Foram incluídos oito cães, fêmeas, castradas, de diferentes raças, com idade entre 1 e 8 anos, obesos, com escore de condição corporal (ECC) igual ou superior a 8 e composição corporal determinada pelo método de diluição de isótopos de deutério. Os cães obesos foram incluídos em um programa de perda de peso e passaram a compor um novo grupo experimental, após a perda de 20% do peso inicial. Um terceiro grupo experimental foi constituído por oito cães, fêmeas, castradas, idade entre 1 e 8 anos e ECC ideal (4 ou 5). A expressão gênica das citocinas imunoinflamatórias (resistina, leptina, adiponectina, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10) foi avaliada por qRT-PCR e, a imunidade foi avaliada através da resposta linfoproliferativa pela técnica de citometria de fluxo. Os dados que apresentaram distribuição normal foram avaliados por análise de variância pelo PROC MIXED do SAS e, quando detectadas diferenças, essas foram comparadas pelo teste de Tukey. Em relação aos dados relativos às expressões gênicas, foi adotado o procedimento PROC GLIMMIX e, utilizou-se a metodologia de modelos lineares generalizados, onde a distribuição Gama demonstrou ser adequada. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos. O período médio de emagrecimento dos animais incluídos no estudo foi de $194,25 \pm 28,31$ dias e a taxa média de perda de peso semanal foi de $1,02 \pm 0,82\%$. Não foram observadas diferenças de peso entre os grupos avaliados e, ao exame de composição corporal, a porcentagem de massa gorda média, tanto em porcentagem ($P < 0,001$) quanto em quilos ($P = 0,012$), foi superior no grupo obeso (8,91kg; 40,88%) e, após o emagrecimento (3,01kg; 19,16%) essa variável não diferiu do grupo controle (4,11kg; 22,10%). O programa de perda de peso resultou em aumento da porcentagem de massa magra corporal

($P=0,001$) dos animais obesos (55,50% vs 77,90%), cujo aumento os tornou semelhantes ao grupo controle (80,84%). O grupo obeso apresentou maior expressão gênica de resistina e interleucina-8 em relação ao grupo emagrecido ($P=0,002$). Para a adiponectina, o grupo obeso também apresentou maior expressão gênica de mRNA quando comparado ao grupo emagrecido ($P=0,003$). A avaliação da proliferação de linfócitos apresentou diferenças entre o grupo de animais obesos antes e após o emagrecimento ($P=0,004$). O regime resultou no aumento da taxa de linfoproliferação (18,48%) em relação ao início do estudo, na condição obesa (10,71%). Estes resultados indicam que a perda de peso modula a resposta imunoinflamatória de cães obesos e, podem indicar benefícios importantes à saúde e longevidade dos animais.

Palavras-chave: Caninos. Citocinas. Emagrecimento. Linfócitos. Obesidade.

ABSTRACT

VENDRAMINI, T.H.A. **Gene expression of the immunoinflammatory response and immunological status of obese dogs and after weight loss.** 2019. 103 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Obesity is characterized by a low degree of chronic inflammation state that, along with metabolic modifications, promotes important changes in animal organism. Adipose tissue actively participates in inflammation and immunity, and several defense cells of the organism may therefore be involved in the diversity found between obese and ideal weight individuals. Studies in relation to this subject have shown immune cell changes in humans and rats, however, the literature is scarce in information in this regard for dogs. Thus, the present study evaluated the gene expression profile of immunoinflammatory response and the lymphoproliferation of obese dogs and the possible alterations resulting after weight loss. Eight dogs, females, neutred, of different breeds, aged between 1 and 8 years, obesities, with body condition score (BCS) equal to or greater than 8 and body composition determined by the deuterium isotope dilution method were included. The obese dogs were included in a weight loss program and began to compose a new experimental group, after losing 20% of their initial weight. A third experimental group consisted of eight dogs, females, neutred, aged between 1 and 8 years and with ideal BCS (4 or 5). Gene expression of immunoinflammatory cytokines (resistin, leptin, adiponectin, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10) were assessed by qRT-PCR and immunity was assessed by lymphoproliferative response using the flow cytometry technique. The data that presented normal distribution was evaluated by analysis of variance by the PROC MIXED of the SAS and, when differences were detected, these were compared by the Tukey test. Regarding the gene expression data, the procedure PROC GLIMMIX was adopted and the methodology of generalized linear models was used, in which the Gamma distribution proved to be adequate. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The mean weight loss period of the animals included in the study was 194.25 ± 28.31 days and the mean weekly weight loss rate was $1.02 \pm 0.82\%$. No differences in weight were observed between the evaluated groups and, in the body composition test, the percentage of average fat mass, both in percentage ($P < 0.001$) and in kilos ($P = 0.012$), was higher for the obese group (8.91kg; 40.88%), returning to normal and without difference to the control group (3.01kg; 19.16%) after weight loss (4.11kg; 22.10%). The weight loss program resulted in an increase in percentage of lean body mass ($P = 0.001$) of obese animals (55.50% vs 77.90%), with no difference in relation to the control

group (80.84%). The obese group presented greater gene expression of resistin and interleukin-8 in relation to the weight loss group ($P=0.002$). In adiponectin, obese group presented higher mRNA gene expression when compared to the weight loss group ($P=0.003$). The evaluation of lymphocyte proliferation showed differences between the group of obese animals before and after weight loss ($P=0.004$). Weight loss resulted an increase in the lymphoproliferation rate (18.48%) compared to the beginning of the study, in the obese condition (10.71%). These results indicate that weight loss modulates the immunoinflammatory response of obese dogs and may indicate important benefits to health and longevity of animals.

Keywords: Canines. Cytokines. Lymphocytes. Obesity. Weight loss.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas envolvidas na instituição de um programa de perda de peso para cães.	33
Figura 2 - Grupos experimentais incluídos no estudo.	43
Figura 3 - Exemplos de animais do grupo obeso e emagrecido (após a perda de 20% do peso inicial) avaliados no estudo.	44
Figura 4 - Exemplos de animais do grupo controle avaliados no estudo.	45
Figura 5 - Períodos, análises e os procedimentos experimentais que foram realizados no estudo.	56
Figura 6 - Curva de emagrecimento do animal A.	59
Figura 7 - Curva de emagrecimento do animal B.	60
Figura 8 - Curva de emagrecimento do animal C.	60
Figura 9 - Curva de emagrecimento do animal D.	61
Figura 10 - Curva de emagrecimento do animal E.	61
Figura 11 - Curva de emagrecimento do animal F.	62
Figura 12 - Curva de emagrecimento do animal G.	62
Figura 13 - Curva de emagrecimento do animal H.	63
Figura 14 - Taxa de perda de peso semanal dos animais incluídos no estudo.	64
Figura 15 - Expressão relativa do mRNA de resistina (A), adiponectina (B) e interleucina-8 (C) no sangue total, comparação entre a expressão de mRNA de citocinas em animais obesos (n = 8) e emagrecidos (n = 8).	67
Figura 16 - Atividade linfoproliferativa antes do estímulo com Fitohemaglutinina (PHA). ...	68
Figura 17- Atividade linfoproliferativa após o estímulo com Fitohemaglutinina (PHA).	69
Figura 18 - Taxa de linfoproliferação dos animais obesos (n = 8) e emagrecidos (n = 8).	70
Figura 19 - Relação entre obesidade, citocinas inflamatórias e seus efeitos no sistema imunológico.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos principais estudos que avaliaram adipocinas em cães obesos e após a perda de peso.	31
Tabela 2 - Resumo dos principais estudos que avaliaram variáveis imunológicas em cães obesos e após a perda de peso.	40
Tabela 3 - Níveis de garantia na matéria natural e ingredientes ¹ do alimento controle utilizado no estudo (segundo o fabricante).	48
Tabela 4 - Sequência de primers utilizados para detectar a expressão dos genes das adipocinas dos cães avaliadas neste estudo.	52
Tabela 5 – Níveis de garantia na matéria natural e ingredientes ¹ do alimento hipocalórico utilizado no estudo (segundo o fabricante).	55
Tabela 6 - Caracterização dos cães incluídos no estudo.	58
Tabela 7 - Exames bioquímicos dos grupos obeso, controle e emagrecido.	65
Tabela 8 - Peso, escore de condição corporal e composição corporal dos grupos obeso, controle e emagrecido.	66
Tabela 9 - Expressão relativa do mRNA das citocinas imunoinflamatórias dos grupos obeso e emagrecido.	66
Tabela 10 - Taxa de linfoproliferação dos grupos obeso, controle e emagrecido.	69

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 - Quantificação e qualidade do RNA das amostras avaliadas.	99
Apêndice 2 - Exemplos das curvas de amplificação dos primers (A), resistina (B), leptina (C) e IL-10 (D) avaliados por qRT-PCR.	101
Apêndice 3 - Valores de eritrogramas encontrados nos grupos experimentais obesos e controle no início do estudo.....	102
Apêndice 4 - Valores de leucogramas encontrados nos grupos experimentais obesos e controle no início do estudo.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina monofosfato
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEPEN Pet	Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos
CFSE	Corante fluorescente diacetato de carboxifluoresceína éster succinimidílico
CT	<i>Threshold cycle</i> ou limiar do ciclo
DEPC	Dicarbonato de dietila
DMSO	Dimetilsulfóxido hibri-max
ECC	Escore de condição corporal
EE	Extrato etéreo
EMM	Escore de massa muscular
FA	Fosfatase alcalina
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IL-1RA	Antagonista do receptor de IL-1
IL-2	Interleucina-2
IL-22	Interleucina-22
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IMC	Índice de massa corporal
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
NEPP	Necessidade energética para perda de peso
NEM	Necessidade energética de manutenção

NK	Células natural killer
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso meta
qRT-PCR	<i>Transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SDHA	Succinato desidrogenase, complexo subunidade A da flavoproteína
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPPS	Taxa de perda de peso semanal
USP	Universidade de São Paulo
VNP	Departamento de Nutrição e Produção Animal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1.	OBESIDADE.....	23
2.1.1.	DEFINIÇÃO	23
2.1.2.	PREVALÊNCIA.....	23
2.1.3.	CAUSAS.....	24
2.1.4.	DIAGNÓSTICO	25
2.1.5.	CONSEQUÊNCIAS	26
2.1.6.	ADIPOCINAS	26
2.1.7.	CONTROLE E TRATAMENTO	33
2.2.	SISTEMA IMUNOLÓGICO	35
2.2.1.	CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	35
2.2.2.	CONSEQUÊNCIAS DA OBESIDADE NO SISTEMA IMUNOLÓGICO	37
3	HIPÓTESE	41
4	OBJETIVOS.....	42
4.1.	PRINCIPAL	42
4.2.	SECUNDÁRIO.....	42
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1.	LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS	42
5.2.	TRIAGEM DOS ANIMAIS	46
5.3.	HEMOGRAMA E PERFIL BIOQUÍMICO.....	46
5.4.	PERÍODO DE ADAPTAÇÃO	47
5.5.	COMPOSIÇÃO CORPORAL	48
5.6.	EXPRESSÃO GÊNICA DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA.....	49
5.6.1.	COLETA DE SANGUE	49
5.6.2.	TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE RNA	49
5.6.3.	TÉCNICA DE SÍNTESE DE DNA	50
5.6.4.	QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS POR q-RT-PCR.....	50
5.7.	TESTE DE LINFOPROLIFERAÇÃO	53
5.7.1.	COLETA DE SANGUE	53
5.7.2.	EXTRAÇÃO DE MATERIAL CELULAR	53

5.7.3.	AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	54
5.8.	PROTOCOLO DE EMAGRECIMENTO DOS CÃES	54
5.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
6	RESULTADOS.....	57
6.1.	ANIMAIS	57
6.2.	ERITROGRAMA E LEUCOGRAMA.....	59
6.3.	EMAGRECIMENTOS	59
6.4.	EXAMES BIOQUÍMICOS	65
6.5.	COMPOSIÇÃO CORPORAL	65
6.6.	EXPRESSÃO GÊNICA DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA.....	66
6.7.	LINFOPROLIFERAÇÃO.....	68
7	DISCUSSÃO.....	71
8	CONCLUSÕES	81
9	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a relação entre os animais de companhia e os seres humanos assume papel fundamental na sociedade. O aumento da ligação de afeto entre seres humanos e os cães por um lado atribuiu maior relevância aos cuidados com a saúde e bem-estar dos animais, por outro lado, provocou em muitos casos, os efeitos da “humanização” desses *pets*, que acabam por resultar nos animais, alterações existentes no homem. A obesidade torna-se assim a principal doença nutricional não só nos seres humanos, mas também nos animais de companhia e, por consequência, as diversas transformações do excesso de peso tornam-se preocupantes.

No conceito atual, o tecido adiposo é considerado um órgão dinâmico e, o aumento dos depósitos corporais de gordura estão relacionados com profundas alterações de algumas funções fisiológicas. Mais de 100 hormônios, citocinas e outras substâncias de sinalização celular (chamadas de adipocinas) secretadas pelo tecido adiposo foram identificadas; e a participação ativa do tecido adiposo na inflamação e consequentemente na imunidade ocorre pelo desequilíbrio na produção e liberação destas adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, que por consequência, levam à proposição de que a obesidade pode ser considerada como um estado de inflamação crônica de baixo grau.

O sistema imune consiste numa rede de células, tecidos e órgãos que atuam na defesa do organismo e, baseado principalmente no prévio status inflamatório do paciente, estudos em seres humanos e ratos tem demonstrado que a obesidade pode resultar em mudanças negativas nas funções deste sistema, contribuindo para o surgimento e/ou agravamento de doenças. Em cães são escassos os estudos que tenham avaliado tal relação e, desta maneira, a avaliação da possível conexão entre a obesidade e o sistema imunológico de cães e, as prováveis alterações resultantes após o emagrecimento são os objetivos deste estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. OBESIDADE

2.1.1. DEFINIÇÃO

Em termos gerais, a obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017) como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar o bem-estar e a vida saudável. Em outra clássica definição, o *National Institute of Health* (NIH, 1985) também classifica a obesidade como o acúmulo excessivo de energia sob a forma de tecido adiposo, suficiente para contribuir como doença. Já em definição mais recente e específica aos animais de companhia, Laflamme (2012) classificou a obesidade como uma síndrome clínica resultante do excesso de gordura corporal, suficiente para comprometer a saúde e a função de diferentes órgãos e sistemas. Assim, é possível constatar que todas as definições apontam o aspecto comum da relação da obesidade com o possível comprometimento da saúde, o que enaltece a importância de seu estudo.

2.1.2. PREVALÊNCIA

A obesidade em pessoas atingiu proporções epidêmicas, com mais de 1,9 bilhão de adultos com excesso de peso e destes, mais de 650 milhões obesos (OMS, 2017). O aumento contínuo desta enfermidade em adultos é uma tendência comum, especialmente em mulheres de países em desenvolvimento (PUOANE et al., 2002), inclusive em países em desenvolvimento com subnutrição. A obesidade é uma condição complexa, com sérias dimensões sociais e psicológicas, afeta todas as idades e grupos socioeconômicos e, é um dos principais contribuintes para a carga global de doenças crônicas e incapacidade (OMS, 2017). Dessa forma, além do crescimento do número de pessoas acima do peso, ocorre aumento consequente na incidência de doenças secundárias e dos encargos econômicos associados ao seu tratamento (AGUILAR-VALLES et al., 2015). Dados os riscos para a saúde associados à obesidade, estima-se que o excesso de peso corporal seja a causa subjacente de cerca de 2,8 milhões de mortes por ano (OMS, 2017).

Na atualidade, a relação entre os animais de companhia e os seres humanos assume função fundamental na sociedade. Essa relação ganhou característica intimista e, ultrapassou a esfera utilitária da posse de animais para constituir relações pautadas pela afetividade. O

aumento da ligação de afeto entre o ser humano e o animal por um lado atribuiu maior valor aos cuidados com a saúde e bem-estar dos cães. Por outro lado, resultou em muitos casos nos efeitos da “humanização” desses *pets*, que acabou por espelhar nos animais, comportamentos e doenças existentes no homem (LAFLAMME, 2012). A obesidade torna-se assim a principal doença nutricional não só nos seres humanos, mas também nos animais de companhia. Segundo German (2006), nas últimas décadas a incidência de obesidade em animais de companhia em geral, tem aumentado de forma significativa, talvez até de forma mais extrema do que nos seres humanos e, tornou-se preocupação séria na medicina veterinária.

Na população de cães, alguns estudos avaliaram a frequência desta afecção e, entre eles, destaca-se o estudo de Gossellin et al. (2007), que em abordagem geral, descreveu frequências que variaram entre 20-40% dos cães na população estudada. Em outro estudo que envolveu 21.754 cães, nos Estados Unidos, observou-se que 29% dos animais estavam em sobrepeso e 5,1% eram obesos (LUND et al., 2005). Na Austrália foi encontrada a frequência de 41% de animais em sobrepeso (MCGREEVY et al., 2005). Já na Europa, estes valores variaram de 24% (em estudos mais antigos) a 41% de obesidade nos cães avaliados em estudo mais recente (EDNEY & SMITH, 1986; HAND et al., 1989; CRANE, 1991; MONTROYA-ALONSO et al., 2017). Na China, um estudo avaliou 2391 cães e destes 44% foram considerados obesos (MAO et al., 2013) e, um estudo recente realizado no Japão demonstrou que 39,8% dos animais avaliados foram considerados em sobrepeso e 15,1% obesos (USUI et al., 2016). No Brasil, dados preliminares de nosso grupo de pesquisa apontam frequência de 41,0% de sobrepeso e obesidade em cães na cidade de São Paulo - SP (PORSANI & BRUNETTO, 2018; dados não publicados).

2.1.3. CAUSAS

Ao se apurar a origem da palavra obesidade, é possível verificar que o termo vem do latim *obesus*, que por sua vez, deriva de *obedere*, *ob* (sobre) e *edere* (comer), ou seja, comer em excesso, devorar. Esta definição vai ao encontro das causas do excesso de peso. Estas são multifatoriais e, podem estar associadas a fatores genéticos e ambientais. No entanto, a obesidade está principalmente relacionada com o desequilíbrio energético (ZORAN, 2010), excetuando-se os casos relacionados a outras alterações, como por exemplo, doenças endócrinas. Ou seja, em termos gerais, para explicar a principal causa da obesidade, podemos nos basear nos princípios de transformação e armazenamento de energia, em que muitas calorias consumidas ou pouco utilizadas pelos animais, levam ao acúmulo de gordura no tecido adiposo.

Portanto, o que faz com que o animal apresente excesso de peso corporal é o longo período em situação de balanço energético positivo (OSTO & LUTZ, 2015).

2.1.4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da obesidade baseado apenas no peso corporal do animal é muito incerto, principalmente se avaliarmos as diferentes raças de cães e cruzamentos existentes e, a determinação do peso ideal nestas diversas variáveis. Na rotina clínica de avaliação, técnicas mais simples e de menor custo são utilizadas e, podem fornecer medidas mais subjetivas da composição corporal. A morfometria é uma delas e, baseia-se na medição de uma série de pontos no corpo do animal, como dobras cutâneas e em avaliações dimensionais [em que várias medidas de estatura são combinadas com o peso (GERMAN, 2006)]; é um procedimento não invasivo e mais utilizado em humanos para caracterizar grupos e populações. Apesar das medidas morfométricas em humanos já serem utilizadas rotineiramente (PETROSKI, 1995), em cães a grande diversidade de porte e raças não caracteriza esta metodologia como de boa precisão.

A avaliação do escore de condição corporal (ECC) é uma técnica que fornece uma boa relação com a composição corporal e por consequência, com a obesidade ou excesso de peso, por meio de um sistema de pontuação. Trata-se de uma técnica subjetiva, mas de boa precisão, baixo custo e prática. Vários sistemas foram sugeridos, sendo a escala de 9 (nove) pontos, a mais aceita. O sistema é visual e tátil e, tem por objetivo buscar características que se correlacionam (gordura subcutânea, gordura abdominal e musculatura superficial), por meio de avaliação da caixa torácica, processos espinhosos dorsais e cintura (LAFLAMME, 1997a).

Para validar e comprovar a boa precisão da utilização de ECC, German (2006) constatou boa correlação entre o escore de condição corporal e a composição corporal dos animais, também avaliados por técnicas de maior precisão, consideradas padrão-ouro. Outras metodologias de pesquisa em potencial para avaliação da composição corporal incluem análise química, densitometria, utilização de isótopos estáveis, ultrassonografia, condutância elétrica e técnicas de imagens avançadas [como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética (GERMAN, 2006)].

A definição exata da obesidade envolve a determinação da composição corporal do animal. O conceito mais importante é a relação entre a composição de massa gorda (tecido adiposo) e massa corporal magra (BURKHOLDER, 2001). Desta forma, a metodologia de diluição de isótopos de deutério é uma técnica considerada padrão-ouro em medicina e

medicina veterinária porque permite a determinação precisa do volume de água corporal e, como a água mantém uma relação relativamente estável com a massa magra, seu cálculo é preciso e por consequência, pode-se determinar o conteúdo de massa gorda do indivíduo (FERRIER et al., 2002).

2.1.5. CONSEQUÊNCIAS

Os efeitos deletérios do excesso de peso na saúde de cães e gatos são bastante citados na literatura e, incluem desde redução da longevidade (KEALY et al., 2002) como alterações ortopédicas (BROWN et al., 1996; KEALY et al., 1997; KEALY et al., 2000), cardiovasculares (EDNEY & SMITH, 1986; ROCHA et al., 2007; PEREIRA-NETO et al., 2010; PEREIRA-NETO et al., 2014; PIANTEDOSI et al., 2016; TROPF et al., 2017), respiratórias (HENDRICKS, 1992; GERMAN, 2006; BACH et al., 2007; DEVITO et al., 2015; PEREIRA-NETO et al., 2018) e desordens metabólicas, como resistência insulínica (BRUNETTO et al., 2011b) e hiperlipidemia (CHIKAMUNE et al., 1995; JEUNETTE et al., 2005; BRUNETTO et al., 2011a).

Descobertas sobre as propriedades metabólicas do tecido adiposo e sobre sua capacidade em produzir hormônios atuantes em processos fisiológicos e fisiopatológicos, modificaram os conceitos sobre a biologia do adipócito (KERSHAW & FLIER, 2004; TRAYHURN & WOOD, 2005; FONSECA-ALANIZ et al., 2006; BALISTRERI et al., 2010). O aumento dos depósitos corporais de gordura foi relacionado com profundas alterações de metabolismo, que refletem nas funções fisiológicas (GAYET et al., 2004; TRAYHURN, 2005; GERMAN et al., 2010; BRUNETTO et al., 2011b). Alterações estas que são base para o aumento do risco de doenças e redução da expectativa de vida, em cães, gatos e seres humanos.

Essas alterações são relativas à produção e a liberação de uma variedade de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, que são associados à presença de inflamação crônica de baixo grau, caracterizada por desregulação de uma rede de vias de sinalização inflamatória, produção anormal de citocinas (adipocinas) e aumento das concentrações de proteínas de fase aguda circulantes (MAURY & BRICHARD, 2010).

2.1.6. ADIPOCINAS

Das adipocinas conhecidas, a mais estudada é a leptina, mas outras, tais como adiponectina, resistina, interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF- α) e, interferon gama também são citadas (TILG & MOSCHEN, 2006; ZORAN, 2010).

Embora a leptina seja secretada por adipócitos, o aumento da secreção é baseado no fluxo de energia dentro destas células e, as concentrações circulantes de leptina correlacionam-se com a massa de gordura (ISHIOKA et al., 2002; DIEZ et al., 2004; GAYET et al., 2007). Em seres humanos, o receptor de leptina é amplamente expresso em células hematopoiéticas e imunes (SANCHEZ-MARGALET et al., 2003; ZHAO et al., 2003).

As concentrações de leptina estão aumentadas nos animais obesos e, ao contrário do que ocorre com esta adipocina, a obesidade resulta na diminuição dos teores de adiponectina circulantes. Em um estudo com cães obesos e magros, leptina, triglicérides e colesterol apresentaram correlação positiva com o ECC, enquanto correlação negativa foi observada para adiponectina e serotonina (PARK et al., 2014). Em outro recente estudo, Piantedosi et al. (2016) observaram alterações similares, onde os cães obesos apresentaram maiores concentrações de leptina sérica e, menor concentração de adiponectina do que os cães em peso normal, informações consistentes com os trabalhos anteriores (JEUSETTE et al., 2005; ISHIOKA et al., 2007).

Em gatos adultos, Coradini et al. (2013) compararam as concentrações de leptina e adiponectina séricas em jejum e pós-prandial, antes e após 8 semanas de alimentação *ad libitum* para promover o ganho de peso. Os autores ainda avaliaram diferentes tipos de dieta e observaram que apesar do curto período de tempo, o ganho de peso e maior acúmulo de tecido adiposo apresentaram efeito positivo nas concentrações de leptina. Hoenig et al. (2007) avaliaram 12 gatos magros e 16 obesos e, verificaram que a adiponectina apresentou correlação negativa com a massa gorda corporal e, a leptina, correlação positiva.

Outros marcadores inflamatórios da obesidade nos animais de companhia e sua relação com a perda de peso foram menos estudados. Todavia, sabe-se que o tecido adiposo sintetiza e libera outros fatores pró-inflamatórios tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 (IL-1), proteína C reativa e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (DAS et al., 2003; KHAODHIAR et al., 2004; CHRISTIANSEN et al., 2005, FRANK et al., 2015).

Todos estes mediadores são considerados marcadores inespecíficos da inflamação crônica (MRAZ & HALUZZIK, 2014) e, esta inflamação de baixo grau constante tem sido teorizada como um elo para possíveis alterações das funções imune em longo prazo em humanos (VIEIRA-POTTER, 2014), porém as informações são bastante limitadas para cães e gatos.

Baixas concentrações de TNF- α são primordiais para a defesa do hospedeiro por limitarem a propagação de microrganismos patogênicos para a corrente sanguínea, desencadeando a adesão neutrofílica, ativação de citocinas e do sistema complemento. Porém, com a sua hiper-estimulação, o quadro inflamatório evolui. O TNF- α assume assim atividade deletéria ao organismo, o qual desregula o sistema imune e promove a ativação de várias outras citocinas, bem como do sistema oxidativo celular (AZEVEDO, 2007; CIANCIARULLO et al., 2008).

A IL-6 é uma citocina com extensa gama de atividades biológicas, pois ajuda a controlar a indução da resposta de fase aguda e também é um mediador para a troca de classe de imunoglobulinas. Também é capaz de influenciar em várias respostas inflamatórias que possuem importância na patogenia de diversas alterações e infecção bacteriana, sendo assim considerada a principal reguladora da resposta de proteínas de fase aguda (VAN SNICK, 1990; VAN DER POLL & VAN DEVENTER, 1999). Em cães obesos, poucos estudos quantificaram as concentrações circulantes desta adipocitocina, porém, na maioria deles foi observada correlação positiva entre aumento de gordura corporal e aumento de IL-6 circulante (GERMAN et al., 2009, BRUNETTO, 2010; FRANK et al., 2015).

A IL-8 é uma potente substância atrativa para neutrófilos. Sua ação é mediada por receptores CXCR1 e CXCR2 acoplados a proteína G (GPCRs), que têm alta afinidade por quimiocinas glutamina-leucina-arginina positivas (MUKAIDA, 2003, KIM et al., 2011). A IL-8 tem sido detectada em vários tecidos humanos acometidos por condições inflamatórias crônicas associadas com severa infiltração neutrofílica (GIUSTIZIERI et al., 2001; WOODMAN et al., 2006). Em equinos, desafios antigênicos levaram ao aumento da expressão de IL-8 e seu respectivo mRNA nos pulmões de animais acometidos por doença pulmonar crônica e obstrução recorrente de vias aéreas, condições também associadas a importantes alterações imunes (FRANCHINI et al., 2000, AINSWORTH et al., 2006). Ainda em monogástricos, a IL-8 também tem sido implicada na patogênese da endotoxemia equina. Endotoxinas foram capazes de aumentar a expressão de IL-8 nos neutrófilos *in vitro* (NEUDER et al., 2009) e no sangue de cavalos, quando injetadas sistemicamente (NIETO et al., 2009). Dessa forma, a IL-8 é uma citocina chave no processo inflamatório crônico, associada às alterações imunoinflamatórias. Estudos atuais encontraram concentrações decrescentes de IL-8 e outras IL com a perda de peso em cães (BASTIEN et al., 2015; VITGER et al., 2017).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória importante na fisiopatologia da inflamação, que tenta contrabalançar as ações dos mediadores pró-inflamatórios, tanto através da redução da síntese e da liberação desses mediadores, quanto antagonizar seus efeitos.

Por outro lado, a produção e liberação excessiva de mediadores anti-inflamatórios são prejudiciais à resposta do organismo contra o agente invasor, pois inibe a liberação dos mediadores fundamentais para o recrutamento e ativação das células da resposta inflamatória e imunes (DINARELLO, 1997; BENJAMIM, 2001; VAN DER POLL, 2001).

Nos últimos anos, uma nova adipocina foi identificada e tem sido chamada de resistina (com referência para “resistência à insulina”); detectada pela primeira vez em camundongos e posteriormente em humanos, essa adipocina foi muito pouco explorada em cães. Todavia, pesquisadores acreditam que ela possa explicar como a obesidade predispõe à resistência insulínica (STEPPAN et al., 2001).

Com a perda de peso, alguns autores demonstraram que as alterações no perfil de secreção destas citocinas tendem a ser corrigidas (HU et al., 1996; MOULIN et al., 2009; BRUNETTO, 2010). Em outro atual estudo sobre o impacto da perda de peso em citocinas circulantes em cães da raça Beagle, Bastien et al. (2015) observaram que citocinas pró-inflamatórias diminuíram ao longo do programa de perda de peso, sendo estas relacionadas à inflamação de baixo grau induzida pela obesidade e à co-morbididades associadas a este estado.

Assim, como o tecido adiposo está de maneira ativa envolvido na síntese de várias moléculas de sinalização e hormônios relacionados ao equilíbrio energético, alguns recentes estudos em cães se concentraram na avaliação do perfil de expressão gênica e, baseiam-se na compreensão das alterações metabólicas que ocorrem neste tecido durante o ganho ou perda de peso (GRANT et al., 2011; GODOY & SWANSON, 2013; SÖDER et al., 2017).

Grant et al. (2011) foram alguns dos pesquisadores que investigaram as mudanças fisiológicas e da expressão gênica durante os estágios iniciais do ganho de peso e na obesidade em cães. Nesse estudo, Beagles fêmeas castradas foram alimentadas *ad libitum* ou com quantidade calculada para manutenção por um período de 24 semanas. Como esperado, a alimentação *ad libitum* levou ao aumento de peso corporal, massa gorda e tamanho de adipócitos. O início da obesidade também levou à expressão alterada de genes no tecido adiposo, sendo que vários genes relacionados ao estresse oxidativo estavam aumentados com o ganho de peso corporal.

Gayet et al. (2007) também avaliaram os efeitos da obesidade canina e resistência à insulina na expressão de genes implicados no metabolismo de glicose e lipídios no músculo esquelético e no tecido adiposo. A obesidade aumentou as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e leptina, mas diminuiu as concentrações plasmáticas de adiponectina. Os pesquisadores formularam a hipótese de que a adiponectina plasmática reduzida se deve a supressão de genes específicos.

Um resumo de todos os trabalhos que avaliaram a concentração circulante ou expressão gênica de adipocinas em cães obesos e após a perda de peso está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo dos principais estudos que avaliaram adipocinas em cães obesos e após a perda de peso.

Ano	Autor	Número de animais	Origem dos animais	Avaliou por expressão gênica	Tipo de obesidade	Principais resultados
2002	ISHIOKA et al.	59	Tutores	Não	Adquirida	Cães obesos apresentaram maiores concentrações de leptina plasmática do que os cães com ECC ideal
2002	SAGAWA et al.	20 (beagles)	Canil	Não	Induzida	Relação positiva entre a concentração plasmática de leptina e o conteúdo de gordura corporal em cães
2004	DIEZ et al.	8 (beagles)	Canil	Não	Induzida	Concentrações circulantes de leptina correlacionam-se com a massa de gordura corporal
2004	GAYET et al.	24	Canil	Não	Induzida	Concentrações plasmáticas do fator de crescimento semelhante à insulina 1, TNF- α e ácidos graxos não esterificados aumentaram progressivamente durante o período de superalimentação
2005	JEUSSETE et al.	24 (beagles)	Canil	Não	Induzida	Cães obesos demonstraram diminuição na grelina plasmática e aumento nas concentrações de leptina e insulina quando comparados com os cães controle. Durante a perda de peso, observou-se aumento na concentração de grelina e redução na leptina e insulina plasmática
2007	GAYET et al.	13 (beagles)	Canil	Sim	Induzida	A expressão e concentração plasmática de leptina foi aumentada, enquanto a concentração plasmática e expressão de adiponectina reduziram com o ganho de peso
2007	ISHIOKA et al.	166	Tutores	Não	Adquirida	A concentração de leptina plasmática foi maior nos cães com ECC mais elevado
2009	GERMAN et al.	26	Tutores	Não	Adquirida	Perda de peso levou a decréscimos nas concentrações plasmáticas de TNF-alfa, haptoglobina e proteína C-reativa

2010	BRUNETTO	20	Tutores	Não	Adquirida	Cães obesos apresentaram maiores concentrações séricas circulantes de leptina, TNF α e IL-6 e esses valores reduziram após a perda de peso
2011	GRANT et al.	9 (beagles)	Canil	Sim	Induzida	Alimentação <i>ad libitum</i> aumentou o peso corporal, massa gorda, tamanho dos adipócitos e leptina
2012	TVARIJONAVICIUTE et al.	6 (beagles)	Canil	Não	Adquirida	Concentrações de adiponectina aumentaram após o período de perda de peso
2013	VAN DE VELDE et al.	8 (beagles)	Canil	Não	Induzida	O ganho de peso em cães não alterou as concentrações de TNF- α e IL-6
2014	PARK et al.	100	Tutores	Não	Adquirida	Leptina, triglicérides e níveis de colesterol foram maiores no grupo obeso. Níveis de adiponectina foram maiores no grupo magro comparado ao grupo obeso
2015	BASTIEN et al.	18 (beagles)	Canil	Não	Induzida	Citocinas diminuíram ao longo do programa de perda de peso e foram correlacionadas com a porcentagem de gordura (MCP-1, IL-7, IL-2 e IL-18)
2015	FRANK et al.	92 (labradores)	Tutores	Não	Adquirida	Concentrações plasmáticas de IL-6 e MCP-1 em jejum estão associadas ao aumento do ECC
2016	PIANTEDOSI et al.	40	Tutores	Não	Adquirida	Cães obesos apresentaram leptina sérica mais alta, mas menores concentrações de adiponectina em comparação a cães com peso normal
2017	VITGER et al.	16	Tutores	Não	Adquirida	Diminuição da leptina em ambos os grupos (com 6 e 12 semanas de emagrecimento). IL-8 e MCP-1 diminuíram em 6 semanas e IL-8 e colesterol em 12
2019 (submetido)	JEREMIAS et al.	20	Tutores	Não	Adquirida	Concentrações séricas de triglicerídeos, IL-2, IL-6, TNF- α , insulina, leptina e IGF-1 diminuíram após a perda de peso

2.1.7. CONTROLE E TRATAMENTO

O balanço energético positivo é, portanto, o principal determinante da obesidade e suas consequências. Desta maneira, a perda de peso promovida pelo estabelecimento do balanço energético negativo é o primeiro passo para o controle e tratamento da obesidade. O balanço energético negativo é baseado na redução das calorias consumidas pelos animais, associada ou não ao aumento do gasto energético. Desta forma, para obtenção da energia necessária, o animal mobiliza seus estoques orgânicos de gordura com a mínima perda de tecido muscular (NRC, 2006). A redução das calorias consumidas pelos animais é o principal objetivo de um programa de perda de peso e, este é realizado por meio de diversas etapas (Figura 1).

Figura 1- Etapas envolvidas na instituição de um programa de perda de peso para cães.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Inicialmente é necessária a avaliação do excesso de peso do animal realizada através da avaliação do ECC. Na sequência, calcula-se o peso meta (PM) do animal. Assim, cães com ECC 7, o PM será o peso atual multiplicado pela constante 0,85; já para cães com ECC 8 ou 9, o PM será o peso atual multiplicado pela constante 0,8 (CARCIOFI et al., 2005; BRUNETTO et al., 2011b; PEREIRA-NETO et al., 2018).

O programa prossegue com o cálculo da necessidade energética para perda de peso (NEPP), através da equação:

$$NEPP = 70 \times PM^{0,75} = \text{Kcal /dia}$$

Com a necessidade energética do animal em mãos, é calculada a quantidade de alimento diário que será fornecido, pela equação:

$$\text{Quantidade diária(g)} = NEPP / \text{Energia metabolizável do alimento (Kcal/g)}$$

Nesta etapa, a escolha do alimento correto é fundamental para o sucesso do programa de perda de peso, pois as dietas destinadas ao emagrecimento devem apresentar características próprias. Dentre elas, a principal é a baixa densidade energética, com manutenção do consumo dos nutrientes não energéticos para assim propiciar o balanço energético negativo (FEDIAF, 2018). Outra característica importante é o teor mais elevado de proteína, característica de extrema importância nesse tipo de alimentos para a manutenção da massa magra corporal, com o intuito de minimizar a perda de massa muscular durante o regime (NRC, 2006). Além disso, a maior inclusão de fibra dietética também é desejável. As fibras resultam na redução da densidade energética do alimento, auxiliam no controle da glicemia e lipidemia, retardam a absorção dos nutrientes e assim, auxiliam na sensação de saciedade durante o regime (NRC, 2006).

O emprego de amido de assimilação lenta também é desejável (sorgo, cevada, lentilha e ervilha). Segundo Carciofi et al. (2008), os alimentos à base de lentilha, ervilha e sorgo proporcionaram a manutenção de maiores concentrações glicêmicas por mais tempo e, minimizaram a onda pós-prandial imediata produzida por alimentos formulados com amido de rápida digestão. Como a glicemia e a insulinemia estão diretamente relacionadas à saciedade,

estes amidos de digestão lenta são recomendados nos casos de obesidade, colaborando para a minimização da fome dos animais em regime de restrição alimentar.

Além dos cuidados anteriores, é de extrema importância também se estabelecer a taxa de perda de peso semanal (TPPS), com o propósito de se evitar a perda excessiva e, inclusive a possível perda de massa muscular relacionada ao excesso de peso perdido, ou o oposto, insuficiente perda de peso que não garanta a efetividade do programa. O cálculo da TPPS mínima (TPPS mín) e a TPPS máxima (TPPS máx) é realizado através das equações:

$$\text{TPPS mín (g)} = \text{Peso atual (kg)} \times 10$$

$$\text{TPPS máx (g)} = \text{Peso atual (kg)} \times 20$$

Assim, com a quantidade diária de alimento que deve ser fornecida, o peso meta e a taxa de perda de peso semanal estabelecidos, o programa de perda de peso está estabelecido. Os animais devem ser reavaliados a cada 15 dias, para que ajustes sejam realizados de acordo com a resposta individual de cada animal. Se todas as etapas forem efetuadas de maneira adequada, sem alterações por parte dos tutores, o programa tem grandes chances de atingir a meta esperada. Além de todas as etapas, a prática de atividade física deve ser estimulada como estratégia para aumentar o gasto energético e auxiliar na manutenção da massa magra durante o regime (CARCIOFI et al.; 2005).

2.2. SISTEMA IMUNOLÓGICO

2.2.1. CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Cães e gatos estão expostos a uma série de microrganismos, incluindo vírus, bactérias e fungos. Caracterizado como um sistema de proteção do indivíduo, o sistema imunológico protege o hospedeiro da entrada de organismos infecciosos e no caso de haver acesso, restringe a invasão, erradica os microrganismos invasores e, assim, evita o desenvolvimento de infecção (SAMARTÍN & CHANDRA, 2001). Esse sistema é composto por um conjunto de estruturas e processos biológicos formados por uma rede de células, tecidos e órgãos especializados (TIZARD, 2013) que por meio de diferentes mecanismos celulares e moleculares são projetados para detectar e destruir partículas estranhas e seus produtos (JANEWAY, 1999). Desta maneira, com a finalidade de manter a homeostase do organismo, através do combate às agressões em geral, as células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico e, a

sua resposta coletiva e coordenada formam a resposta imunológica (UTHAISANGSOOK et al., 2002).

O sistema imunológico pode ser dividido em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata (natural ou antígeno não específica) atua em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independente de estímulo prévio, já existente antes do estabelecimento de uma infecção (SIGAL & RON, 1994). Esta imunidade consiste de barreiras físicas (pele, mucosas, glândulas e secreções) e fatores solúveis, como o sistema complemento e diversos componentes celulares, incluindo granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos), mastócitos, macrófagos, células dendríticas e células natural killer (NK) (DRANOFF, 2004).

Os constituintes da imunidade inata estão situados em locais estratégicos de constante contato com agentes provenientes do meio externo. A imunidade inata promove assim a linha de defesa inicial contra fatores indesejáveis e em muitos casos, consegue reduzi-los ou eliminá-los. Esta imunidade estimula e influencia também as respostas imunes adaptativas (ABBAS & LICHTMAN, 2005). A imunidade adaptativa é induzida pela memória celular como resultado da exposição de microrganismos invasores ou determinantes antigênicos. Trata-se de uma resposta muito eficaz na prevenção da propagação da infecção, que elimina os organismos invasores (SAMARTÍN & CHANDRA, 2001). Esta inclui os elementos da imunidade inata: anticorpos, linfócitos B, responsáveis pela produção dos anticorpos e, os linfócitos T (CD4+ e CD8+) que medeiam a imunidade celular. Desta maneira, diversas são as células existentes e envolvidas no sistema imunológico, bem como suas diferentes funções e características (QUIXABEIRA & SADDI, 2008). A resposta imune adaptativa é desenvolvida de forma mais lenta, mas manifesta-se como aumento da especificidade antigênica e memória. As células T natural killer e as células T $\gamma\delta$ são linfócitos citotóxicos que se encaixam na interface da imunidade inata e adaptativa (DRANOFF, 2004).

As citocinas são hormônios proteicos tipicamente conhecidos como mediadores e reguladores de respostas imunes e inflamatórias, estas podem ser reconhecidas por neurônios e utilizadas para desencadear diversas reações celulares que influenciam na atividade, proliferação e sobrevivência das células imunológicas. Dentre todas as adipocinas relacionadas com processos inflamatórios, sem dúvida, a IL-6, IL-8, o TNF- α , a leptina (pró-inflamatórias) e a interleucina (IL-10) e adiponectina (anti-inflamatória) vêm recebendo atenção especial dos pesquisadores. Porém, podem ser citadas ainda as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-7 (IL-7), e anti-inflamatórias: interleucina-4 (IL-4), e interleucina-13 (IL-13) (OLIVEIRA, 2011).

2.2.2. CONSEQUÊNCIAS DA OBESIDADE NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Como mencionado, os adipócitos são agora reconhecidos como integrantes de um tecido endócrino ativo, uma vez que produzem numerosos hormônios, citocinas, substâncias vasoativas e outros peptídeos denominados adipocinas ou adipocitocinas, que se comunicam com o cérebro, leucócitos, células locais e tecidos periféricos (TRAYHURN, 2005; GERMAN et al., 2010). Estas adipocinas fornecem uma ligação importante entre a obesidade e vários distúrbios imunológicos (MATARESE & LA CAVA, 2004; WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005).

A inflamação crônica de baixo grau é co-responsável por esses distúrbios (HOTAMISLIGIL, 2006), e segundo Milner e Beck (2012) os processos imunológicos envolvidos na defesa do organismo são afetados pelo estado nutricional. Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado que tanto a incidência quanto a gravidade de várias doenças infecciosas são mais prevalentes em seres humanos obesos quando comparadas com pessoas em peso ideal e, de acordo os mesmos autores (MILNER & BECK, 2012), foi observada resposta imune linfocitária prejudicada de humanos obesos, o que os predispõe a infecções, redução da resposta vacinal e má cicatrização de feridas.

Modelos animais que mimetizam uma resposta imune alterada na obesidade são limitados a roedores, nos quais a obesidade é alcançada geneticamente ou induzida em curto prazo por dieta, ambos resultando em obesidade rápida e mórbida. Os cães são cada vez mais aplicados para elucidar o aparecimento de distúrbios metabólicos, pois apresentam forte homologia genética e assemelham-se à variação da obesidade (leve sobrepeso à obesidade mórbida), potencialmente um bom modelo animal para a obesidade humana (BERGMAN et al., 2006).

Estudos demonstraram que a leptina está relacionada ao desenvolvimento de linfócitos T no timo, na homeostase e função de células T e outras respostas imunológicas pró-inflamatórias (FAGGIONI et al., 2001; SANCHEZ-MARGALET et al., 2003; MATARESE & LA CAVA, 2004). A leptina ativa neutrófilos polimorfonucleares, exerce atividades proliferativas e anti-apoptóticas dos linfócitos T, afeta a produção de citocinas, regula a ativação de macrófagos e, contribui para a cicatrização de feridas (OZATA et al., 1999), enquanto a adiponectina é um potente imunossupressor (YOKOTA et al., 2003).

Os efeitos anti-inflamatórios da adiponectina parecem ser devido à capacidade desta em suprir a produção de TNF- α por macrófagos, pois quando cultivados com adiponectina, inibiram sua atividade fagocitária (OUCHI et al., 2000; YOKOTA et al., 2000). Wolf et al.

(2004) observaram também que a presença de adiponectina em ensaios de proliferação de células T resultou na diminuição da capacidade para induzir resposta halogênica. Neste estudo, a adiponectina também induziu a produção de citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10 e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) por monócitos humanos, macrófagos e células dendríticas e suprimiu a liberação de interferon gama (responsável por ativar macrófagos, potencializar outros interferons e modular a atividade dos linfócitos B). A IL-1RA desempenha papel importante na resolução natural da inflamação, pois neutraliza a IL-1, que é uma interleucina pró-inflamatória.

Outra função imunitária adaptativa relacionada à obesidade que é mediada pela adiponectina é a inibição da linfopoiese das células B (YOKOTA et al., 2000), a adiponectina também promove a remoção de células apoptóticas e melhora a inflamação sistêmica e as características de autoimunidade (linfoproliferação) em camundongos (TAKEMURA et al. 2007). Desta maneira, a adiponectina é provavelmente um importante agente que afeta a função imune, baseado principalmente no seu possível efeito anti-inflamatório (ZORAN, 2010).

A função de impacto sobre as células imune é talvez a chave para a compreensão do possível estado imunodeficiente associado à obesidade. Como visto em humanos obesos, evidências destacam a importância do estágio pró-inflamatório e, por consequência, as alterações da secreção de imunomoduladores, incluindo leptina, adiponectina e as citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-6 e IL-1, para com a defesa do organismo (FANTUZZI, 2005; KOERNER, 2005; TILG & MOSCHEN, 2006).

As pesquisas relacionadas à obesidade e imunidade em humanos são temas bastante atuais. Em pessoas obesas, menor resposta de anticorpos do que em indivíduos magros foi observada após vacinação contra a hepatite B (MATARESE & LA CAVA, 2004) e, outro estudo identificou que indivíduos obesos apresentaram propensão à redução da resposta imunológica frente à administração de vacina, quando comparado a indivíduos em condição corporal adequada (PAINTER et al., 2015). A baixa resposta imune protetora expõe esses indivíduos ao maior risco de infecções e complicações. Estes dados indicam que as vacinas podem não fornecer adequada proteção em indivíduos obesos.

Outros estudos nesta linha em humanos obesos demonstraram alterações das células imunes em comparação com pessoas em peso ideal. Dentre eles, Nieman et al. (1999) demonstraram discrepâncias consideráveis no número de leucócitos, atividade fagocítica e *burst* oxidativo dos monócitos entre os indivíduos magros e obesos, além da proliferação de linfócitos diminuída quando submetidos à estimulação policlonal, informação desconhecida até

o momento em cães. Além disso, a cicatrização de feridas mostrou-se comprometida após procedimentos cirúrgicos (FASOL et al., 1992, PLOTKIN et al., 1996).

Os monócitos e macrófagos do próprio tecido adiposo têm sido identificados como importantes contribuintes ao surgimento de distúrbios relacionados com a obesidade, pois estes são fontes de citocinas pró-inflamatórias, pró-coagulantes e citocinas de fase aguda. Seu número e atividade podem inicialmente aumentar com a obesidade, consequente à hipertrofia dos adipócitos (LAFONTAN, 2005). Embora os macrófagos estejam envolvidos entre os leucócitos primeiramente identificados no tecido adiposo hipertrofiado, segundo O'Rourke & Lumeng (2013), existem evidências de papel importante dos linfócitos B e T em animais obesos.

Em animais, a obesidade tem sido associada à imunidade comprometida em roedores (MORIGUCHI et al., 1998; MORETTA et al., 2002; LUND et al., 2005). German (2006) sugeriu também a diminuição da função imunológica em cães e gatos obesos, mas poucos estudos avaliaram especificamente o sistema imunológico nessas espécies animais e sua relação com a obesidade; os principais artigos estão apresentados na Tabela 02.

Tabela 2 - Resumo dos principais estudos que avaliaram variáveis imunológicas em cães obesos e após a perda de peso.

Ano	Autor	Espécie	Número de animais	Origem dos animais	Tipo de obesidade	Principais resultados
2006	GREELEY et al.	Cães	48 (labradores)	Canil	Adquirida	Cães que mantiveram o ECC ideal apresentaram menor declínio relacionado à idade na resposta linfoproliferativa a mitógenos e menor declínio relacionado à idade na contagem total de linfócitos (populações de células T, CD-4 e CD- 8)
2012	VAN DE VELDE et al.	Cães	16	Canil	Induzida	O ganho de peso aumentou o número de linfócitos e imunoglobulinas A e M e foi responsável pela maior proliferação de células mononucleares do sangue
2013	VAN DE VELDE et al.	Cães	8 (beagles)	Canil	Induzida	Observou-se diminuição da proliferação de linfócitos T induzida por mitógenos, mas esta alteração pareceu ser transitória após a estabilização do peso corporal
2017	VITGER et al.	Cães	16	Tutores	Adquirida	A perda de peso resultou em melhoria de variáveis imunometabólicas, enquanto que o nível de atividade física não resultou em benefícios adicionais

Em gatos, Jaso-Friedmann et al. (2008) avaliaram vinte e oito animais obesos e doze animais magros divididos de forma uniforme e aleatória em dois grupos alimentados com dietas com ácidos graxos saturados ou ácidos graxos poli-insaturados (ômega-3) durante um período de seis meses. Os autores não observaram correlação entre a condição corporal e a dieta em qualquer uma das respostas funcionais quantitativas e qualitativas do sistema imunológico. Porém, a obesidade foi induzida para o estudo e, desta maneira era de curto prazo, o que pode não ter refletido as alterações previstas no status imunológico dos animais.

O estudo de Jaso-Friedmann et al. (2008) contrasta com um estudo em seres humanos, onde foi observada correlação positiva entre o índice de massa corporal (IMC) e o total de glóbulos brancos, neutrófilos e linfócitos (TILG & MOSCHEN, 2006).

Em pessoas obesas, verificou-se que o número de células NK (tipo de linfócitos, glóbulos brancos responsáveis pela defesa específica do organismo) estava dentro do intervalo de referência (NIEMAN et al., 1999; SEAMAN, 2000; YOKOTA et al., 2003). Contudo, foram relatados resultados relativos ao efeito da obesidade e da atividade citotóxica das células NK (NIEMAN et al., 1999; SANTAGOSTINO et al., 1999; SEAMAN, 2000). Componentes dietéticos, tais como carboidratos ou gordura, influenciam a citotoxicidade. Os carboidratos têm sido correlacionados de forma positiva e, a gordura dietética de forma negativa com a estimulação dependente de IL-2 (citocina pró-inflamatória) da atividade das células NK (MORIGUCHI et al., 1998).

Ainda, dado a importância do assunto no cenário atual, em um trabalho recém-publicado, Vitger et al. (2017) avaliaram parâmetros imunometabólicos em cães com sobrepeso durante a perda de peso com ou sem um programa de exercícios. Através da avaliação de leptina circulante, adiponectina, proteína C reativa, MCP-1, IL-8 e colesterol, os autores concluíram que para ambos os grupos a perda de peso resultou em indícios de melhora da saúde imunometabólica, porém a intensidade de atividade física avaliada no estudo não agregou benefícios adicionais.

3 HIPÓTESE

Cães obesos apresentam alterações na expressão gênica de adipocinas imunoinflamatórias e imunidade em relação aos animais controle.

O emagrecimento modula essas alterações na expressão gênica de adipocinas imunoinflamatórias e imunidade, com retorno a normalidade.

4 OBJETIVOS

4.1. PRINCIPAL

Analisar o perfil de expressão gênica da resposta imunoinflamatória e status imunológico de cães obesos e as possíveis alterações resultantes após o emagrecimento.

4.2. SECUNDÁRIO

Avaliar os efeitos de um programa de emagrecimentos nas variáveis bioquímicas e composição corporal de cães obesos e após o emagrecimento.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais empregados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), sob protocolo nº 4668091214.

5.1. LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS

O estudo foi desenvolvido nas dependências do Setor de Atendimento de Cães e Gatos e de Diagnóstico da Unidade Didática Clínico Hospitalar (UDCH) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) e no Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN Pet) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP.

Foram incluídos oito cães, fêmeas, castradas, de diferentes raças, com idade entre 1 a 8 anos e provenientes do atendimento de rotina dos serviços da UDCH. Todos os animais eram adultos obesos, ECC 9 (costelas não palpáveis, grande quantidade de gordura subcutânea, acúmulo de gordura na região lombar e na base da cauda e cintura pouco aparente ou não visível) conforme escala descrita por Laflamme (1997a) e composição corporal determinada pelo método de diluição de isótopos de deutério como descrito por Ferrier et al. (2002) e

Brunetto et al. (2011). Os cães obesos foram incluídos em um programa de perda de peso e passaram a compor um novo grupo experimental, com realização de novas avaliações (grupo de cães obesos, após a perda de 20% do peso inicial). Um terceiro grupo experimental foi constituído por oito cães saudáveis, fêmeas, castradas, idade entre 1 e 8 anos, em condição corporal ideal (escore 4 ou 5). Na Figura 2 estão esquematizados os grupos experimentais incluídos no estudo e, as figuras 3 e 4 exemplificam alguns dos animais do grupo obeso e emagrecido (após a perda de 20% do peso inicial) e do grupo controle, respectivamente.

Figura 2 - Grupos experimentais incluídos no estudo.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Figura 3 - Exemplos de animais do grupo obeso e emagrecido (após a perda de 20% do peso inicial) avaliados no estudo.

Obeso

Emagrecido

Obeso

Emagrecido

Obeso

Emagrecido

Obeso

Emagrecido

Figura 4 - Exemplos de animais do grupo controle avaliados no estudo.

5.2. TRIAGEM DOS ANIMAIS

Inicialmente os cães passaram por exame físico completo, avaliação nutricional, avaliação do ECC e EMM (escore de massa muscular), leucograma e eritrograma, e perfil bioquímico [albumina, glicose, proteínas totais, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)].

O escore de massa muscular consiste em sistema de quatro pontos em exame visual e de palpação ao longo dos ossos temporais, escápulas, vértebras lombares e ossos pélvicos desenvolvido por Michel et al. (2011).

Somente participaram do estudo indivíduos cujos resultados dos exames físicos e laboratoriais estavam dentro do intervalo de referência para a espécie (para os cães não obesos) ou condizentes com a condição de acúmulo de gordura corporal (para os cães obesos). Portanto, foram aceitos somente cães obesos por ingestão excessiva de alimento, excluindo-se as demais causas de obesidade.

Por fim, foram excluídos do estudo cães obesos que apresentavam limitação ao estabelecimento do protocolo terapêutico da obesidade, como distúrbios cardiorrespiratórios, do aparelho locomotor, hepáticos, gastroentéricos, renais, endócrinos (diabetes mellitus, hiperadrenocorticism, hipotireoidismo) e, proprietários que não estavam dispostos a cumprir, rigorosamente, o manejo alimentar padrão proposto neste experimento.

5.3. HEMOGRAMA E PERFIL BIOQUÍMICO

As amostras foram obtidas através da coleta de sangue de modo asséptico por venopunção das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas. Exceto para a realização do hemograma, para o qual uma alíquota de 4mL de sangue foi colocada em tubo de ensaio contendo EDTA com anti-coagulante, todos os demais exames foram realizados a partir de amostras de soro sanguíneo dos cães. Para avaliação da glicemia, uma alíquota de 3mL de sangue foi acondicionada em tubo de ensaio com fluoreto de sódio para conservação do conteúdo. Todas as colheitas foram realizadas com os animais em jejum de 12 horas.

Os hemogramas foram realizados no Laboratório Lab Animal – Diagnóstico Veterinário (Leme - SP) em contador eletrônico, para uso veterinário, da marca ABX® (ABC Vet, Horiba Medical, FR). Os hematócritos foram determinados por meio de tubos microcapilares e a

contagem diferencial dos leucócitos foi realizada por microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, corados por panótico rápido, no mesmo laboratório.

Todas as análises referentes ao perfil bioquímico foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ / USP, por meio do emprego de kits comerciais e conforme as metodologias e recomendações dos fabricantes. A creatinina sérica foi analisada através do emprego de kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil) pelo método picrato alcalino; a alanina aminotransferase (ALT) pelo emprego do kit comercial da marca Biosystems (Barcelona, Espanha), pelo método IFCC e; para a aspartato aminotransferase (AST) foi utilizado o kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil) utilizando a metodologia cinética-UV. A fosfatase alcalina foi analisada mediante o emprego de kit comercial da marca Biosystems (Barcelona, Espanha), pelo método IFCC/SEQC.

As análises de colesterol e triglicérides séricos foram realizadas com o emprego de kit comercial da marca Biosystems (Barcelona, Espanha), pelo método glicerol fosfato oxidase/peroxidase e, as análises de proteínas totais foram realizadas através do kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil), pelo método do biureto.

A albumina foi determinada através do kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil), pelo método verde de bromocresol e; a ureia sérica através do método enzimático FS uréase GLDH utilizando kit comercial da marca Diasys (Holzheim, Alemanha). Em relação a glicemia, esta foi analisada mediante o emprego de kit comercial da marca Labtest (Lagoa Santa, Brasil), pelo método GOD-TINDER.

5.4. PERÍODO DE ADAPTAÇÃO

Finalizada a triagem, tanto o grupo obeso, como o grupo controle passaram a receber um alimento de manutenção (Golden Fórmula – Cães Adultos / Frango e Arroz, Premier Pet Indústria e Comércio Ltda, Dourado, Brasil) por 28 dias para padronização da dieta nas análises iniciais, cujo os níveis de garantia em matéria natural e ingredientes (segundo o fabricante) está apresentada na Tabela 3.

A necessidade energética de manutenção (NEM) de cada animal foi calculada pela equação:

$$NEM = 95 \times (PC)^{0,75} = \text{Kcal/dia.}$$

A quantidade diária de alimento fornecida para cada animal foi determinada, por fim, pela divisão da necessidade energética individual e a energia metabolizável do alimento empregado no estudo.

Tabela 3 - Níveis de garantia na matéria natural e ingredientes¹ do alimento controle utilizado no estudo (segundo o fabricante).

Item	%	unidade / kg	unidade / 1000 kcal de EM ²
Umidade (máxima)	10,00	100g	26g
Proteína bruta (mínima)	23,00	230g	61g
Extrato etéreo (mínimo)	12,00	120g	32g
Matéria mineral (máxima)	7,50	75g	20g
Matéria fibrosa (máxima)	3,00	30g	8g
Cálcio (máximo)	1,60	16g	4g
Fósforo (mínimo)	0,70	7000mg	1845mg
Energia metabolizável	-	3795kcal	-

¹Farinha de carne, farinha de vísceras de frango, proteína isolada de suíno, milho integral moído, quirera de arroz, polpa de beterraba, farelo de arroz desengordurado, gordura de frango, gordura suína, semente de linhaça, hidrolisado de suíno e frango, ácido propiônico, antioxidantes BHA e BHT, cloreto de potássio, cloreto de sódio, levedura seca de cervejaria, parede celular de levedura, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, cloreto de colina, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina, iodeto de potássio, proteinato de selênio, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco.

²Energia metabolizável.

5.5. COMPOSIÇÃO CORPORAL

A composição corporal dos animais foi determinada pelo método de diluição de isótopos de deutério. Os cães permaneceram em jejum alimentar por 8 horas antes do início desta avaliação e, hídrico por duas horas. Foi administrado 1mL/kg de peso corporal de uma solução de óxido de deutério diluído a 10%, por via subcutânea. Amostras de sangue (3mL) foram coletadas da veia jugular imediatamente antes e após 02 horas à inoculação de óxido de deutério. Estas foram processadas para extração de soro e armazenadas em temperatura -20°C até a análise.

O enriquecimento por deutério das amostras foi determinado por espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS, Calixto System - Sercon Ltda, Gateway, Reino Unido) no Laboratório de Espectrometria de Massas de Razão Isotópica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto – SP. A composição corporal dos cães foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Ferrier et al. (2002) e adaptada por Brunetto et al. (2011b).

Após a quantificação da água corpórea foi calculada a massa magra total e por diferença a massa gorda (expressa na forma de porcentagem). Esta avaliação foi realizada no início do estudo nos animais do grupo obeso e, após a perda de peso, com o intuito de quantificar a porcentagem de massa gorda dos indivíduos incluídos no estudo. Os animais do grupo controle (magros) passaram pela mesma avaliação.

5.6. EXPRESSÃO GÊNICA DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA

A expressão gênica das citocinas foi avaliada por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real quantitativo (qRT-PCR), segundo os protocolos descritos por Tamura et al. (2014) e Massoco (2018). As citocinas e genes de referência avaliados foram: resistina, leptina, adiponectina, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e succinato desidrogenase - complexo subunidade A da flavoproteína (SDHA).

5.6.1. COLETA DE SANGUE

As amostras foram obtidas através da coleta de sangue (5mL) de modo asséptico por venopunção das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas. Na sequência, foram acondicionadas em frascos com EDTA para que em até 20 minutos após a coleta o sangue de cada animal fosse dispensado em criotubo na relação 250 μ L de sangue para 750 μ L de TRIzol™ LS Reagent (Thermo Fisher Scientific – Invitrogen, Carlsbad, USA), posteriormente este material foi armazenado a -80°C até serem levadas e analisadas no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada da FMVZ-USP.

5.6.2. TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE RNA

No Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada da FMVZ-USP, também segundo os protocolos descritos por Tamura et al. (2014) e Massoco (2018), cada amostra armazenada foi descongelada e centrifugada por 5 minutos a 1200g e a 4°C, posterior a centrifugação, 1,5mL do sobrenadante foi transferido para um microtubo com 400 μ L de clorofórmio e foi incubado por 2 a 3 minutos.

Na sequência, uma nova centrifugação foi realizada (15 minutos a 1200g, a 4°C) e, após este procedimento, a fase aquosa foi submetida a extração de RNA total pelo kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante.

A concentração de RNA total foi quantificada por meio da leitura espectrofotométrica em Nanodrop a 260nm e, a qualidade do RNA foi verificada pela razão de DO 260nm/280nm, os resultados obtidos estão apresentados no Apêndice 1.

5.6.3. TÉCNICA DE SÍNTESE DE DNA

Para a síntese de cDNA com a enzima Superscript (Life Technologies, Carlsbad, EUA) foi utilizado 100ng de RNA total de cada amostra. Foi adicionado 1µL de Oligo dT a 50µM (Life Technologies, Carlsbad, EUA), 4µL de dNTP Mix a 10mM (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e completado para 20µL com água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC, do inglês *diethylpyrocarbonate*). A solução foi incubada em termociclador por 5 minutos a 65°C e 1 minuto a 4°C. A amostra foi amplificada seguindo o ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 60 segundos, seguida de 42 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e, extensão de 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi avaliada em triplicata para cada gene. Toda reação de qRT-PCR continha um controle negativo.

5.6.4. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS POR q-RT-PCR

A quantificação dos níveis de expressão das citocinas foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real quantitativo (do inglês, *quantitative real time polymerase chain reaction*) e monitoradas pelo método de incorporação de SYBR Green (SYBR Select Master Mix - Applied Biosystems, Foster City, EUA) com primers específicos (Tabela 4). Os cDNAs foram diluídos 10 vezes para a amplificação dos produtos dos genes descritos. No Apêndice 2 estão exemplificadas as curvas de amplificação dos primers (A), resistina (B), leptina (C), IL-10 (D) avaliados neste estudo.

Os cDNAs foram utilizados em triplicata. A quantificação foi realizada em sistema de PCR em tempo real Step One Plus® (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A confirmação dos produtos de amplificação foi realizada por meio da análise da curva de dissociação. O método utilizado para análise da expressão genica através do ensaio de qRT-PCR foi o Delta-

Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para tal, foi calculado inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (*threshold cycle* ou limiar do ciclo) do gene endógeno (SDHA) dos valores de CT do gene alvo pela seguinte fórmula:

Tabela 4 - Sequência de primers utilizados para detectar a expressão dos genes das adipocinas dos cães avaliadas neste estudo.

Gene	Sequência dos primers 5` a 3`	Tamanho do amplicom (pb)	n.º de acesso no GenBank	Referência
Resistina	F ¹ – ACAGAACCTGGGAGTTGGTG R ² – GGAAGCCGTGATACCAAGAA	167	XM_005632937.2	VENDRAMINI, T.H.A (2019)
Adiponectina	F ¹ – AAGGAGATCCAGGTCTTGTGTTGG R ² – TTCCAGATGAAGGAGCACAGAG	416	LT963133.1	EISELE et al. (2005)
Leptina	F ¹ – CTGTGCCAATCCGAAAAGTC R ² – GTCTGTTCAGAGCCACCACC	387	NM_001003070.1	EISELE et al. (2005)
Interleucina - 8/CXCL8	F ¹ – CTCTCTGTGAAGCTGCAGTTCTG R ² – GGAAAGGTGTGGAGTGTGTTTTT	81	NM_001003200	TAMURA et al. (2014)
Interleucina -10	F ¹ – CGGGAGGGTGAAGACTTTCT R ² – GGCATCACCTCCTCCAAGTA	144	NM_001003077	TAMURA et al. (2014)
Interleucina - 6	F ¹ – TTAAGTACATCCTCGGCAAAATCT R ² – CAGTGCCTCTTTGCTGTCTTCA	86	NM_001003301	TAMURA et al. (2014)
Fator de necrose tumoral alfa	F ¹ – TCTCGAACCCCAAGTGACAAG R ² – CAACCCATCTGACGGCACTA	86	NM_001003301	TAMURA et al. (2014)

¹ Forward; ² Reverse.

$$\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{gene endógeno - SDHA})$$

Após a determinação do ΔCT das amostras, foi escolhido como amostra normalizadora para todas as análises o cDNA dos animais do grupo controle. Para o cálculo do $\Delta\Delta CT$ utilizou-se a fórmula:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Amostra}) - \Delta CT (\text{Amostra animal controle})$$

Uma vez determinado o $\Delta\Delta CT$, a expressão relativa da amostra alvo em relação a amostra controle foi obtida por meio do uso da seguinte fórmula:

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

5.7. TESTE DE LINFOPROLIFERAÇÃO

5.7.1. COLETA DE SANGUE

As amostras foram obtidas através da coleta de sangue (5mL) de modo asséptico por venopunção das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas. Na sequência, foram acondicionadas em frascos com heparina de lítio e levadas ao Laboratório de Bioinformática e Genômica Aplicada à Veterinária do VNP/FMVZ-USP para extração inicial de material celular.

5.7.2. EXTRAÇÃO DE MATERIAL CELULAR

Em um tubo cônico de centrifugação (tipo Falcon) de 15mL estéril, o sangue coletado foi diluído na proporção de 1mL de sangue em 3mL de tampão fosfato salino (PBS) comum estéril, ou seguindo esta relação. Posteriormente, ao sangue diluído foi adicionado o Ficoll – Paque Plus (GE Healthcare, Illinois, USA) na proporção de 1:2 respectivamente de Ficoll e sangue diluído.

O constituinte foi então centrifugado por 25 minutos a 900g e 20°C, sem *breake* e, após centrifugação, a banda de linfócitos foi despejada em outro tubo cônico de centrifugação de

15mL estéril com 10mL de PBS comum estéril e centrifugado novamente por 5 minutos a 300g e 8°C. Ao fim da centrifugação, o material sobrenadante foi dispensado e nova centrifugação similar foi realizada (5 minutos a 300g e 8°C).

Após a segunda centrifugação, novamente o sobrenadante foi dispensado e foi elaborada uma solução de congelamento com o material coletado, 900µL de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e 100µL de dimetilsulfóxido hibri-max (DMSO) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). O material foi então acondicionado em tubo criogênico e congelado por redução gradiente em freezer -80°C.

5.7.3. AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O material armazenado a -80°C foi então levado ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada da FMVZ-USP e analisado. O ensaio foi conduzido em placas para microtitulação de 96 poços e fundo em “U”. Os linfócitos sanguíneos foram obtidos pela separação em partículas de ferro e após purificação e lavagens em meio RPMI-1640 foram adicionados 200µL/poço (concentração equivalente a 1×10^5 células). O mitógeno utilizado foi a Fitohemaglutinina (PHA). As placas foram incubadas por 72 horas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Decorridas 72 horas de incubação, as células foram coletadas e a avaliação da proliferação realizada em citômetro de fluxo modelo FACS Calibur (Becton & Dickinson, Nova Jersey, USA) com corante fluorescente diacetato de carboxifluoresceína éster succinimidílico (CFSE). Para análise dos dados de fluorescência, foram considerados os índices de proliferação celular. Para a obtenção e análise dos resultados, foi utilizado o software FlowJo (TreeStar).

5.8. PROTOCOLO DE EMAGRECIMENTO DOS CÃES

Para o emagrecimento, os cães obesos foram alimentados com sua necessidade energética de perda de peso (NEPP) (BRUNETTO et al., 2011b), estimadas para o peso meta (PM), utilizando-se como equação:

$$\text{NEPP (necessidade energética para perda de peso)} = 70 \times (\text{PM})^{0,75} = \text{Kcal/dia.}$$

Foi considerado como peso meta, o peso inicial de cada cão subtraindo-se 20% (CARCIOFI et al., 2005; BRUNETTO et al., 2011b; PEREIRA NETO et al., 2018).

A quantidade diária de alimento fornecida para cada animal foi determinada, por fim, considerando-se a energia metabolizável do alimento hipocalórico empregado no estudo (Premier Nutrição Clínica Obesidade – Cães Médio e Grande Porte, Premier Pet Indústria e Comércio Ltda, Dourado, Brasil) e a necessidade energética de emagrecimento de cada cão. Os níveis de garantia na matéria natural e ingredientes (segundo o fabricante) do alimento utilizado no projeto está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Níveis de garantia na matéria natural e ingredientes¹ do alimento hipocalórico utilizado no estudo (segundo o fabricante).

Item	%	unidade / kg	unidade / 1000 kcal de EM²
Umidade (máxima)	10,00	100g	34g
Proteína bruta (mínima)	35,50	355g	119g
Extrato etéreo (mínimo)	8,00	80g	27g
Matéria mineral (máxima)	7,50	75g	25g
Matéria fibrosa (máxima)	15,00	150g	50g
Cálcio (máximo)	1,30	13g	4g
Fósforo (mínimo)	0,60	6000mg	2014mg
Energia metabolizável	-	2979kcal	-

¹Farinha de vísceras de frango, glúten de trigo, proteína isolada de suíno, plasma suíno em pó, ovo desidratado, farinha de ervilha, cevada, quirera de arroz, celulose, polpa de beterraba, gordura de frango, óleo de peixe, hidrolisado de suíno e frango, ácido propiônico, antioxidante BHA, β -glucano, cloreto de potássio, cloreto de sódio, extrato de yucca, frutoligossacarídeos, gelatina hidrolisada (2,5%), L-carnitina, levedura seca de cervejaria, parede celular de levedura (fonte de MOS), taurina, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, cloreto de colina, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina, ferro aminoácido quelato, iodeto de potássio, manganês aminoácido quelato, proteinato de selênio, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de zinco, sulfato de manganês, zinco aminoácido quelato, cobre aminoácido quelato.

²Energia metabolizável.

A quantidade calculada foi oferecida aos animais pelos tutores, de duas a três vezes ao dia, mediante o fornecimento de um pote medida previamente calculado. A dieta hipocalórica foi padronizada para todos os cães obesos que participaram do estudo. As avaliações dos animais, cálculos da taxa de perda de peso semanal e, reajustes na quantidade de alimento foram realizadas a cada 15 dias. O estímulo da prática de atividade física (em torno de 3 vezes por semana, por pelo menos 15 minutos) foi recomendada para todos os animais participantes do protocolo de emagrecimento. Na Figura 5 estão esquematizados todos os períodos, análises e os procedimentos experimentais que foram realizados no estudo.

Figura 5 - Períodos, análises e os procedimentos experimentais que foram realizados no estudo.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância a 5% de significância, utilizando-se também o PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.3 (SAS, 1995) e, quando detectadas diferenças entre as médias, essas foram comparadas pelo teste de Tukey. Para análise estatística dos dados relativos às expressões gênicas, foi adotado o procedimento PROC GLIMMIX do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.4 (SAS, 1995). O modelo estatístico contemplou o efeito fixo de grupos comparativos (animais obesos e animais emagrecidos), além do efeito aleatório de resíduo. Para essas variáveis utilizou-se a metodologia de modelos lineares generalizados, pressupondo distribuições residuais de Poisson, Binomial Negativa ou Gama. Para todas as distribuições avaliadas foram adotadas funções de ligação logarítmicas. A distribuição Gama demonstrou ser adequada com base nas análises gráficas dos resíduos marginais e pelo critério de AIC, proposto por Akaike (1974).

6 RESULTADOS

6.1. ANIMAIS

Dos 12 animais obesos triados no início do projeto, quatro tutores não continuaram devido à distância, falta de tempo e, comprometimento com a dieta e retornos. Dessa forma, oito cães do grupo obeso continuaram no programa de perda de peso e todos terminaram e atingiram o peso meta. Para o grupo controle foram triados 10 animais, porém também apenas 8 consumiram a dieta padronizada durante todo período de 28 dias sem interrupção e, realizaram todas as análises propostas.

A caracterização completa dos animais incluídos no estudo está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Caracterização dos cães incluídos no estudo.

Animal	Raça	Peso (kg)	Idade (anos)	ECC¹	EMM²
<i>Grupo obeso</i>					
A	SRD ³	24,4	4,0	9	2
B	Yorkshire terrier	5,6	6,8	9	2
C	Golden retriever	39,5	4,5	9	3
D	Teckel	12,0	7,0	9	2
E	SRD ³	38,4	5,8	9	2
F	SRD ³	34,6	7,5	9	2
G	Border Collie	26,6	4,0	9	3
H	Pinscher miniatura	3,5	5,7	9	2
<i>Grupo controle</i>					
I	Border Colie	17,2	1,4	5	2
J	SRD ³	16,4	1,7	5	3
K	SRD ³	23,6	2,7	5	2
L	West Highlhand White Terrier	7,6	1,4	5	2
M	Husky Siberiano	19,6	2,6	5	3
N	SRD ³	12,3	2,0	5	2
O	SRD ³	9,5	1,4	5	2
P	SRD ³	23,4	4,0	5	3
<i>Grupo emagrecido</i>					
A ⁴	SRD ³	19,3	4,5	6	3
B ⁴	Yorkshire terrier	4,4	7,3	6	2
C ⁴	Golden retriever	30,6	5,0	5	3
D ⁴	Teckel	10,0	7,6	6	3
E ⁴	SRD ³	30,8	6,3	6	2
F ⁴	SRD ³	26,3	8,0	6	3
G ⁴	Border Collie	20,2	4,5	5	3
H ⁴	Pinscher miniatura	2,7	6,2	6	2

¹ Escore de condição corporal; ² Escore de massa muscular; ³ Sem raça definida; ⁴ Mesmos animais do grupo obeso após o emagrecimento.

6.2. ERITROGRAMA E LEUCOGRAMA

Os resultados dos eritrogramas e leucogramas realizados nos animais do grupo controle e grupo obeso para triagem e inclusão no estudo estão apresentados nos Apêndices 3 e 4, respectivamente. Os valores de referência adotados foram os descritos por KANEKO (2008).

6.3. EMAGRECIMENTOS

Em relação aos resultados referentes ao emagrecimento dos animais, as Figuras de 6 a 13 ilustram a curva de perda de peso durante todo o programa de perda de peso dos animais incluídos no estudo, respectivamente do animal A ao animal H. Além disso, as figuras ilustram ainda o peso meta proposto para cada animal, estipulado no início do regime.

Figura 6 - Curva de emagrecimento do animal A.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Figura 7 - Curva de emagrecimento do animal B.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Figura 8 - Curva de emagrecimento do animal C.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Figura 9 - Curva de emagrecimento do animal D.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Figura 10 - Curva de emagrecimento do animal E.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Figura 11 - Curva de emagrecimento do animal F.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Figura 12 - Curva de emagrecimento do animal G.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Figura 13 - Curva de emagrecimento do animal H.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

O período médio de emagrecimento dos animais incluídos no estudo foi de $194,25 \pm 28,31$ dias e a taxa média de perda de peso semanal foi de $1,02 \pm 0,82\%$. A distribuição completa das taxas de emagrecimento semanal está ilustrada na Figura 14.

Figura 14 - Taxa de perda de peso semanal dos animais incluídos no estudo.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

6.4. EXAMES BIOQUÍMICOS

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos através do perfil bioquímico. Os resultados de alanina aminotransferase (ALT) foram maiores no grupo de cães emagrecidos em relação aos animais do grupo controle ($P=0,032$). Não houve variação nas demais determinações bioquímicas avaliadas ($P>0,05$).

Tabela 7 - Exames bioquímicos dos grupos obeso, controle e emagrecido.

Variável	Obeso	Controle	Emagrecido	Intervalo de referência ¹	EPM	P
Albumina (g/dL)	3,26	3,19	2,92	2,60 -3,30	0,134	0,832
Glicose (mg/dL)	88,64	90,63	88,63	65-118,00	5,368	0,578
Proteínas totais (g/dL)	6,16	6,67	7,07	5,4-7,10	0,974	0,632
Ureia (mg/dL)	28,67	35,38	41,1	21 -59,09	3,077	0,324
Creatinina (mg/dL)	1,22	1,19	0,93	0,5-1,50	0,459	0,486
Fosfatase alcalina (UI/L)	49,73	25,49	20,69	20-156,00	9,814	0,458
Colesterol (mg/dL)	163,89	215,21	196,22	135 -270,00	11,608	0,194
Triglicérides (mg/dL)	94,07	56,32	57,2	20-112,00	11,424	0,321
AST ² (UI/L)	15,28	13,25	17,35	10-88,00	1,299	0,453
ALT ³ (UI/L)	15,74 ^{ab}	14,11 ^b	25,06 ^a	10-88,00	1,914	0,032

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.¹ Valores de referência segundo Kaneko (2008); ² Aspartato aminotransferase; ³ Alanina aminotransferase.

6.5. COMPOSIÇÃO CORPORAL

Os animais selecionados para compor o grupo obeso apresentaram escore corporal superior aos animais do grupo controle ($P<0,001$) e, após o emagrecimento não houve diferença entre o grupo emagrecido em comparação ao controle (Tabela 8). Não foram observadas diferenças de peso entre os grupos avaliados e, ao exame de composição corporal, a porcentagem de massa gorda média, tanto em porcentagem ($P<0,001$) quanto em quilos ($P=0,012$), foi superior no grupo obeso e, após o emagrecimento, esses valores foram semelhantes ao grupo controle. Além disso, o programa de emagrecimento resultou em aumento da massa magra (%) dos animais obesos ($P=0,001$).

Tabela 8 - Peso, escore de condição corporal e composição corporal dos grupos obeso, controle e emagrecido.

Variável	Obeso	Controle	Emagrecido	EPM	P
ECC ¹	9,00 ^a	5,00 ^b	5,75 ^b	0,383	<0,001
Peso corporal (kg)	22,81	16,06	18,04	2,380	0,515
Gordura (kg)	8,91 ^a	3,01 ^b	4,11 ^b	0,914	0,012
Massa magra (kg)	18,75	13,04	13,92	1,841	0,410
Gordura (%)	40,88 ^a	19,16 ^b	22,10 ^b	2,601	<0,001
Massa magra (%)	55,50 ^b	80,84 ^a	77,90 ^a	3,503	0,001

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.¹ Escore de condição corporal.

6.6. EXPRESSÃO GÊNICA DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA

Os resultados de expressão gênica da resposta imunoinflamatória estão apresentados e parcialmente ilustrados na Tabela 9 e Figura 15, respectivamente. Os valores estão descritos através de expressão relativa, a qual é baseada na taxa de expressão de um gene alvo, comparada com um gene referência, após ser corrigido pelos CT dos genes-controle endógenos e das amostras-controle, desta maneira o grupo controle é utilizado como referência para o cálculo da expressão relativa.

Tabela 9 - Expressão relativa do mRNA das citocinas imunoinflamatórias dos grupos obeso e emagrecido.

Variável	Obeso	EPM	Emagrecido	EPM	P
Resistina	1,07 ^a	0,42	0,14 ^b	0,048	0,002
Adiponectina	1,25 ^a	0,50	0,17 ^b	0,061	0,003
Leptina	7,65	4,32	28,74	28,12	0,286
Fator de necrose tumoral	1,27	0,47	1,08	0,397	0,286
Interleucina-6	1,29	0,50	8,91	7,688	0,111
Interleucina-8	0,76 ^a	0,39	0,05 ^b	0,019	0,002
Interleucina-10	3,74	2,39	6,16	3,517	0,580

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% ajustado pelo Proc Glimmix.

Não foram observadas diferenças da expressão gênica de mRNA de leptina, TNF- α , IL-6 e IL-10 no sangue entre os cães obesos e após emagrecimento.

Em relação a resistina e IL-8, o grupo obeso apresentou maior expressão gênica de mRNA destas citocinas quando comparado ao grupo emagrecido [P=0,002 (para ambos os

genes); Figura 15]. Para adiponectina, o grupo obeso também apresentou maior expressão gênica de mRNA quando comparado ao grupo emagrecido ($P=0,003$; Figura 15).

Figura 15 - Expressão relativa do mRNA de resistina (A), adiponectina (B) e interleucina-8 (C) no sangue total, comparação entre a expressão de mRNA de citocinas em animais obesos ($n = 8$) e emagrecidos ($n = 8$).

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

6.7. LINFOPROLIFERAÇÃO

As Figuras 16 e 17 ilustram o comportamento celular de linfoproliferação antes e após a estimulação com mitógenos de um dos animais avaliados. Cada partícula suspensa e definida passa através do feixe ótico e dispersa a luz de uma forma e, os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou associados a ela podem ser estimulados para a emissão de luz de diferentes frequências, conforme os picos observados.

Os resultados de linfoproliferação obtidos após a análise encontram-se apresentados na Tabela 10 e, de forma individual, ilustrados na Figura 18. Os resultados de avaliação da proliferação de linfócitos em citometria de fluxo com CFSE apresentaram diferenças entre o grupo de animais obesos antes e após o emagrecimento ($P=0,004$). O programa de perda de peso resultou em aumento na taxa de linfoproliferação dos animais [18,48% vs 10,71% (quando obesos)]. Os valores de linfoproliferação encontrados no grupo de cães emagrecidos foram semelhantes aos dos cães do grupo controle (17,25%).

Figura 16 - Atividade linfoproliferativa antes do estímulo com Fitohemaglutinina (PHA).

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Figura 17- Atividade linfoproliferativa após o estímulo com Fitohemaglutinina (PHA).

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

Tabela 10 - Taxa de linfoproliferação dos grupos obeso, controle e emagrecido.

Variável	Obeso	Controle	Emagrecido	EPM	P
Linfoproliferação (%)	10,71 ^b	17,25 ^a	18,48 ^a	1,136	0,004

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

Figura 18 - Taxa de linfoproliferação dos animais obesos (n = 8) e emagrecidos (n = 8).

* p < 0,01 entre os grupos de animais obesos *versus* controle e após o emagrecimento.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

7 DISCUSSÃO

Ao longo do estudo, os cães incluídos no programa de perda de peso apresentaram consumo satisfatório do alimento hipocalórico utilizado, o que demonstra boa palatabilidade, mesmo com baixos teores de gordura em sua composição. A qualidade das fezes produzidas foi adequada, não havendo relato de alterações em nenhum momento do período experimental. Durante o emagrecimento, os cães foram pesados e avaliados a cada 15 dias e nenhuma alteração clínica foi observada. Apesar da diferença encontrada para a ALT (maior para os cães emagrecidos em relação aos animais do grupo controle), todos os valores dos grupos avaliados encontraram-se dentro do intervalo de referência (10-88 UI/L) para a espécie (KANEKO, 2008).

A porcentagem de perda de peso corporal média por semana ficou dentro do recomendável para cães, entre 1 e 2% (LAFLAMME et al., 1997b). Estes resultados são de suma importância, pois demonstram que o programa de emagrecimento em todos os animais foi realizado de maneira saudável e adequada. Geralmente trabalhos com animais de proprietário resultaram em taxa semanal inferior a 1% (CARCIOFI et al., 2005; GERMAN et al., 2007; BRUNETTO et al., 2008; BRUNETTO, 2010). Os estudos citados encontraram taxas de perda de peso semanal de 0,75%; 0,85%; 0,80% e 0,70% respectivamente; a menor porcentagem de perda de peso dos cães de tutores (domiciliados) pode ser explicada principalmente devido a indisponibilidade dos mesmos em cumprir o protocolo terapêutico estabelecido, fornecendo mais calorias do que o programado para os animais (BRUNETTO, 2010), aspecto não observado em nosso estudo, pois os tutores seguiram adequadamente o protocolo estabelecido.

Todos os animais do grupo obeso apresentavam ECC 9, o que indica obesidade grave. Ao exame de composição corporal, a porcentagem média de massa gorda desses animais foi superior a 40% e, é importante salientar que estes cães estavam obesos há pelo menos 2 anos, o que é muito importante, pois alterações de expressão gênica e imunidade podem não ser verificadas através da indução de obesidade, principalmente em um curto período de tempo. O ponto-chave de um programa de perda de peso é a redução da ingestão energética (LINDER et al., 2012; 2013), a fim de promover o balanço energético negativo associado à manutenção da massa magra (MICHEL, 2012) e, isto foi observado em nosso estudo, pois apesar da diferença de composição de massa gorda, a massa magra não apresentou diferenças após o emagrecimento, exceto quando expressa em porcentagem, onde a diferença é apenas observada

por um quesito de relação percentual. Isso é essencial, pois o tecido muscular corporal é metabolicamente ativo e garante maior gasto energético (LAFLAMME et al., 1997b)

Os adipócitos sofrem hiperplasia e hipertrofia para acomodar o aumento da demanda de armazenamento de triglicérides em resposta à super ingestão (HOTAMISLIGIL, 2006) e, as células imunes presentes no tecido adiposo apresentam papel importante durante sua remodelação, em parte através da secreção de citocinas, o que facilita a remodelação da matriz vascular e extracelular necessária para a expansão saudável do tecido adiposo (WERNSTEDT ASTERHOLM et al., 2014). A expansão crônica do tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade induz o recrutamento e o acúmulo excessivo de células imunes e modula as células imunes “inatas” (não linfócitos) e “adaptativas” (linfócitos) (DALMAS et al., 2014). Além disso, também induz a transformação dos adipócitos, incluindo a expressão de genes e proteases intracelulares alteradas, secreção de adipocinas e sinais apoptóticos (PROCACCINI et al., 2013; NAKAMURA et al., 2014; OHASHI et al., 2014).

Desta maneira, os adipócitos liberam quantidades modestas de citocinas pró-inflamatórias durante a transição dos estados magros para obeso, mas a maior parte das citocinas pró-inflamatórias é secretada pelas células imunes circulantes ou associadas ao tecido adiposo (JAGANNATHAN-BOGDAN et al., 2011; NIKOLAJCZYK et al., 2012; FABBRINI et al., 2013; WAGNER et al., 2013; VAN BEEK et al., 2014). Essas incluem concentrações supranormais de IL-1b, IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, IL-22, interferon gama (IFN-g) e TNF- α no plasma, muitas das quais se originam das próprias células imunes (LEE et al., 2014; ACHILIKE et al., 2014).

Entre as citocinas relacionadas ao tecido adiposo, a leptina é a adipocina mais bem caracterizada em animais domésticos (RADIN et al., 2009) e apresenta papel na supressão do apetite e aumento do gasto energético por ligação ao seu receptor nos centros de saciedade hipotalâmico (HESKA & JONES, 2001; BUFF et al., 2002; PIANTEDOSI et al., 2016). A adiponectina apresenta papel importante no aumento da sensibilidade à insulina, estimulando a fosforilação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMP) em órgãos-alvo da insulina, como músculo esquelético e fígado (HOPKINS et al., 2007). Outra adipocina associada à regulação do balanço energético e do metabolismo é a resistina; ela pertence a uma família de proteínas ricas em cisteína, encontradas em regiões de inflamação e, representa a mais “atual” das adipocinas, descoberta em 2001, em ratos (STEPPAN et al., 2001; LAZAR, 2007). A resistina é secretada por monócitos e adipócitos, possui cerca de 108 aminoácidos e peso molecular de 12.5 kDa (GUIMARÃES et al., 2007).

A produção de adipocinas do tecido adiposo pode ser influenciada pelo estado nutricional (TRUJILLO & SCHERER, 2006). Em particular, a obesidade desregula a secreção das adipocinas, o que é geralmente prejudicial à ação da insulina nos tecidos periféricos, como músculo e fígado (LAZAR, 2006). Em humanos e roedores, a produção e liberação alterada de adipocinas na obesidade tem sido implicada na fisiopatologia de diversas doenças, incluindo diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e câncer (RADIN et al., 2009). Embora o aumento da concentração de resistina circulante seja considerado como contribuinte para o desenvolvimento de resistência à insulina e desequilíbrios metabólicos compatíveis com diabetes mellitus do tipo 2 em ratos e seres humanos (JANKE et al., 2002; VILLELA et al., 2004; FANTUZZI, 2005; COSTA & DUARTE, 2006; SILVEIRA et al., 2009), sabe-se muito pouco sobre os papéis/funções da resistina nos cães.

Apesar dos resultados de maior expressão, com as análises realizadas em nosso estudo não podemos avaliar se os animais obesos apresentavam resistência insulínica e se houve melhora na sensibilidade deste hormônio posterior ao emagrecimento. Entretanto, a relação entre obesidade e aumento da expressão de resistina e, sequente redução com o emagrecimento são de extrema importância e, fornecem subsídios para outras pesquisas que avaliem e relacionem estas variáveis.

Em humanos, segundo alguns autores, a expressão de resistina nos adipócitos é reduzida e, elevada nos macrófagos e monócitos, o que sugere importante papel inflamatório. Apesar de ser expressa e secretada em indivíduos magros, sua concentração está comumente mais elevada em indivíduos acima do peso (FANTUZZI, 2005; COSTA & DUARTE, 2006). Assim, em indivíduos obesos, seu aumento está ligado à resistência insulínica associada à esta enfermidade. Seus efeitos no metabolismo da glicose são antagônicos aos da insulina, pois promovem resistência a esse hormônio por meio de aumento da glicogênese hepática, apresentando rápido efeito sobre este tecido (VILLELA et al., 2004).

Estudos realizados em ratos obesos demonstraram que a administração de anticorpos anti-resistina reduz a glicemia e melhora a sensibilidade à insulina. Por outro lado, a administração adicional dessa adipocina resultou em efeitos contrários, como resistência à insulina e diminuição do transporte de glicose induzido pela insulina (JANKE et al., 2002; SILVEIRA et al., 2009). Ainda, alguns autores sugerem que esses mecanismos relacionados à resistina precisam ser mais bem esclarecidos (YAMAUCHI et al., 2002). Em particular, até onde sabemos, a mudança na expressão da resistina com a obesidade nunca foi avaliada em cães, mas recentemente um estudo demonstrou aumento da expressão de resistina em gatos obesos (TAKASHIMA et al., 2016).

Dessa forma, no presente estudo procuramos revelar a expressão gênica de resistina no cão. Os resultados encontrados demonstram que os cães expressam essa adipocina e, o emagrecimento resultou em redução da sua expressão. Um estudo realizado com células do músculo esquelético de ratos (MOON et al., 2003) demonstrou que a resistina inibiu a captação de glicose estimulada pela insulina, presumivelmente pela diminuição da atividade intrínseca dos transportadores de glicose da membrana celular. Como a inibição da captação de glicose implica na falha da sinalização da insulina, acredita-se que a hiper-resistinemia contribua para o desenvolvimento de resistência à insulina e desequilíbrios metabólicos compatíveis com o diabetes mellitus do tipo 2 (RADIN et al., 2009).

Em seres humanos, a resistina possui também grande ação aterogênica pelo aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular-1 e antivasculat-1 em células endoteliais vasculares e, também pelo aumento da atividade do fator NF- κ B, sinalizador para indução de adesão destas moléculas (HERMSDORFF & JOSEFINA MONTEIRO, 2004). Desta maneira, nosso estudo também gera informações relevantes para novas pesquisas envolvendo obesidade e fatores ateroscleróticos em cães obesos.

Embora a resistina tenha sido primeiramente postulada como contribuinte para a resistência à insulina, algumas evidências indicam, também, que essa adipocina está envolvida no processo inflamatório. Alguns agentes pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6 e lipopolissacarídeos podem regular a expressão do gene da resistina. (PANG & LE, 2006). Outra evidência que associa a resistina à inflamação é que as concentrações séricas deste mediador em seres humanos foram associadas com vários marcadores inflamatórios em algumas doenças. Um estudo demonstrou que pessoas que apresentavam sinais severos de inflamação apresentaram concentrações mais elevadas de resistina que indivíduos saudáveis, ou seja, nas pessoas com sinais inflamatórios severos, foi encontrada correlação positiva entre a resistina e marcadores inflamatórios (DEGAWA-YAMAUCHI et al., 2003). Em outro estudo, pesquisadores encontraram correlação também entre as concentrações de resistina e marcadores de inflamação, como TNF- α , IL-6, lipoproteína associada a fosfolipase A2, ao avaliarem 879 indivíduos (REILLY et al., 2004). Nesse estudo, os pesquisadores também observaram relação positiva entre a concentração de resistina e o índice de calcificação da artéria coronária, concluindo novamente que a resistina pode representar um novo elo entre sinais metabólicos, inflamação e aterosclerose.

Em outro estudo, porém *in vitro*, Kaser et al. (2003) demonstraram que a expressão de mRNA de resistina estava aumentada da mesma maneira que fatores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 e IL-6, sugerindo que as concentrações desse hormônio elevadas, podem

corresponder a ligação entre o processo inflamatório e resistência à insulina. Ohmori et al. (2005) encontraram associação entre concentrações séricas de resistina com a presença e severidade da doença arterial coronariana e, também com resistência à insulina, confirmando novamente a hipótese da resistina desempenhar papel de ligação entre a resistência insulínica, inflamação e doença arterial coronariana. O envolvimento da resistina no processo inflamatório crônico, associado à obesidade, constitui hipótese alternativa capaz de justificar a presença dessa proteína, integrante de uma família de proteínas encontradas em regiões inflamatórias, no sangue de indivíduos obesos e, também gera relações para explicar alterações em que as concentrações normais de insulina são insuficientes para uma resposta normal a este hormônio, além disso, traz justificativas para o estudo de fatores ateroscleróticos envolvendo cães obesos.

Em relação à leptina, esta é sintetizada pelo tecido adiposo em resposta à elevação da insulinemia pós-prandial. O aumento de tamanho dos adipócitos funciona como estímulo da secreção de leptina (MARTIN et al., 2001). Portanto, há envolvimento da leptina em algumas das consequências decorrentes da obesidade, dentre elas a própria resistência à insulina. Vários estudos demonstraram aumento da leptina em cães obesos (SAGAWA et al., 2002; ISHIOKA et al., 2002; JEUSETTE et al., 2005; ISHIOKA et al., 2007; BRUNETTO, 2010; PARK et al., 2014; PIANTEDOSI et al., 2016), pois as concentrações circulantes são proporcionais à massa adiposa (ISHIOKA et al., 2002; DIEZ et al., 2004; JEUSETTE et al., 2005; ISHIOKA et al., 2007; GAYET et al., 2007).

Em nosso estudo não foram observadas diferenças no perfil de expressão gênica da leptina no sangue total. Nossos resultados estão apresentados como expressão relativa, a qual é baseada na taxa de expressão de um gene alvo, comparada com um gene referência, seguidos por correção pelos CT dos genes-controle endógenos e das amostras controle. A maioria dos estudos apenas quantifica estas citocinas, e talvez por isso, os resultados tenham sido diferentes.

Em relação à adiponectina, embora alguns estudos tenham demonstrado que esta adipocina se correlaciona inversamente com a gordura corporal (ISHIOKA et al., 2009; MURANAKA et al., 2011; TVARIJONAVICIUTE et al., 2012a; TVARIJONAVICIUTE et al., 2012b; PARK et al., 2014; PIANTEDOSI et al., 2016), outros estudos, principalmente em gatos, não encontraram essa mesma correlação (CORADINI et al., 2013; BJORNVAD et al., 2014; WITZELA et al., 2015). Em nosso estudo, a expressão gênica de adiponectina foi maior nos animais obesos em comparação aos animais emagrecidos, este resultado vai contra a maioria dos estudos publicados na espécie. Na literatura disponível, em humanos, Doumatey et al. (2012) avaliaram a prevalência de adiponectina paradoxalmente alta ou hiperadiponectinemia paradoxal (HAP) em pessoas obesas e, investigou sua relação com o fenótipo de obesidade metabolicamente saudável. Tal

fenótipo foi descrito por Karelis et al. (2008a) como indivíduos obesos com perfis metabólicos favoráveis, caracterizados por adequada sensibilidade à insulina e, perfil lipídico e hormonal normais (KARELIS et al., 2008a; PRIMEAU et al., 2011). Morrison et al. (2010) também avaliaram este paradoxo e, constataram que a adiponectina sérica maior do que a esperada estava associada à esta obesidade “saudável”. Além disso, outro estudo descreveu que cerca de 20 a 30% de pessoas adultas obesas (AGUILAR-SALINAS et al., 2008) apresentaram concentrações elevadas de adiponectina. Assim, apesar de contraditório, na medicina humana existe a classificação de indivíduos “metabolicamente saudáveis, mas obesos” (KARELIS et al., 2008b).

Um ponto muito importante a se considerar são os critérios de seleção de nosso estudo, os quais foram baseados na escolha de indivíduos obesos e “saudáveis”, cujos resultados dos exames físicos (com exceção do ECC) e laboratoriais estivessem dentro dos intervalos de referência para a espécie. Desta maneira, ao se avaliar os exames bioquímicos, hemograma e avaliação de triagem, pudemos constatar esse perfil metabólico saudável. Embora estes achados sejam consistentes e, similares aos do nosso estudo com cães, nenhuma pesquisa até o momento (nem em medicina veterinária, nem em medicina humana) forneceu os mecanismos moleculares que vinculam altas concentrações de adiponectina com um perfil metabólico “favorável”. A este respeito, mais estudos moleculares, incluindo proteômica, metabolômica e genômica, são necessários para identificar adequadamente esse subconjunto de indivíduos obesos com o objetivo de em longo prazo entender a fisiologia envolvida na proteção desses indivíduos contra condições adversas associadas à obesidade, próximos passos do nosso grupo de pesquisa. Uma hipótese que levantamos com base nos resultados encontrados, é a de que os cães obesos respondem às alterações promovidas pelo excesso de peso com o aumento da expressão de adiponectina para contra-balancear os efeitos da resistina e outras citocinas inflamatórias.

Além disso, alguns autores demonstraram que as mulheres apresentaram concentrações mais altas de adiponectina circulante que os homens, apesar do IMC elevado em ambos os grupos (JANKE et al., 2002; CONSIDINE et al., 2008). Até onde sabemos, esta avaliação por gênero não foi estudada em cães e, no nosso estudo, como forma de padronização, foram incluídas apenas fêmeas castradas. Dessa forma, é possível que a variável “gênero” tenha influenciado nos resultados ora encontrados.

A adiponectina e TNF- α podem ser inibidos mutuamente e, a expressão de TNF- α pode ser controlada pela adiponectina. O TNF- α representa um produto de macrófagos relacionado a distúrbios metabólicos e processos crônicos de inflamação (OGAWA et al., 1999). O vínculo molecular entre o TNF- α e a obesidade é que a expressão desta adipocitocina está aumentada

no tecido adiposo e, esta diminui com a perda de peso corporal; resultado já observado em cães por meio da quantificação de citocinas por outra metodologia (GAYET et al., 2004; GAYET et al., 2007; GERMAN et al., 2009; BRUNETTO, 2010; BASTIEN et al., 2015). Diferente do observado no presente estudo, baseado na expressão gênica de mRNA de TNF- α nos animais obesos em comparação aos emagrecidos. Seguindo esta linha de raciocínio, um recente estudo realizado por Bastien et al. (2015), avaliou os efeitos da perda de peso nas citocinas circulantes de cães da raça Beagle, durante o início do emagrecimento, com três meses de emagrecimento e, após seis meses de regime. Os autores observaram que diversas citocinas diminuíram ao longo do programa de perda de peso (MCP-1, IL-7 e IL-2, IL-18) e, apenas o maior período de tempo demonstrou diferenças ou tendências de normalização.

Os resultados obtidos na expressão de mRNA da interleucina-6 (uma adipocina pró-inflamatória) e interleucina-10 (uma adipocina anti-inflamatória) também não diferiram entre os grupos. Outro recente estudo também não demonstrou qualquer redução na citocina pró-inflamatória IL-6 durante a perda de peso (BASTIEN et al., 2015). Na mesma linha, alguns autores avaliaram um programa de ganho de peso em cães Beagle e também não observaram alterações nas concentrações de TNF- α sérico e de IL-6 (VAN DE VELDE et al., 2013). Por outro lado, Frank et al. (2015) verificaram que as concentrações de IL-6 e MCP-1 aumentaram em cães com sobrepeso. Deve-se salientar também que evidências demonstraram que o tecido adiposo visceral produz e secreta três vezes mais IL-6 do que o tecido adiposo subcutâneo (FRIED et al., 1998). A avaliação da expressão gênica não foi realizada em células do tecido adiposo, mas sim em células do sangue e, isto pode ter influenciado nos resultados encontrados. Não há em literatura trabalhos que comparem a expressão gênica da resposta imunoinflamatória em diferentes tecidos corporais de cães obesos e após o emagrecimento, sugestão também para próximos estudos.

As citocinas pró-inflamatórias de maior relevância são: IL-6, TNF- α , a IL-8. Em nosso estudo também foi observado maior expressão de mRNA da IL-8 nos animais obesos quando comparados aos emagrecidos, o que corrobora os resultados em seres humanos. Recentemente, descobriu-se que as concentrações de IL-6 e MCP-1, mas não de IL-8, aumentaram em cães com sobrepeso (FRANK et al., 2015), enquanto outro estudo encontrou concentrações decrescentes de IL-8 e outras interleucinas com perda de peso em cães (BASTIEN et al., 2016). Vitger et al. (2017) objetivaram avaliar as alterações nos indicadores de metabolismo da glicose (glicemia de jejum, insulina e peptídeo C), colesterol, adipocinas, leptina e adiponectina, além de parâmetros inflamatórios (proteína C reativa, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1) em resposta à restrição dietética com ou sem exercício físico. Os autores observaram diminuição de

citocinas pró-inflamatórias (IL-8) após o emagrecimento, porém apenas no grupo que além da restrição energética, realizava atividade física. Isso está de acordo com estudos em humanos, nos quais o exercício físico demonstrou reduzir as concentrações plasmáticas desses parâmetros em indivíduos obesos (TRØSEID et al., 2004; BEAVERS et al., 2010). No entanto, os autores não puderam determinar se a diminuição observada no grupo emagrecido com atividade física foi induzida pela perda de peso e exercício, ou principalmente pela perda de peso, porém, o mesmo efeito não foi observado no grupo emagrecido sem atividade física, mas neste grupo as concentrações iniciais já eram baixas. Todos os tutores de nosso estudo foram estimulados a intensificar a atividade física de seus animais, inclusive para auxiliar no programa de emagrecimento, assim os resultados de redução da IL-8 dos animais após emagrecimento também podem ser justificados tanto pelo emagrecimento através da restrição energética, quanto pelo aumento da atividade física.

Pesquisas na literatura humana apontam essa ligação entre o aumento das concentrações de mediadores pró-inflamatórios nos obesos e a melhora desses parâmetros com a perda de peso (DAS et al., 2003; CHRISTIANSEN et al., 2005), e pesquisas recentes indicam que a IL-8, um potente quimioatrativo e ativador de neutrófilos, também pode estar elevada em indivíduos obesos (CARPAGNANO et al., 2010). Em seres humanos, estudos nesta área demonstraram que a IL-8 apresenta correlação positiva com o índice de massa corpórea e aumento de gordura visceral (CARPAGNANO et al., 2010; CIORTEA et al., 2014). O acúmulo progressivo de monócitos e macrófagos no tecido adiposo contribui para o aumento das concentrações de sinais pró-inflamatórios, sendo liberados em conjunto com os adipócitos (CIORTEA et al., 2014).

Em relação aos resultados de imunidade, uma forma bastante interessante na defesa do organismo contra a invasão ou proliferação de qualquer agente biológico considerado estranho é a ação dos linfócitos; células fundamentais dentro de um organismo, que são relacionadas a defesa, inativação e retirada de agentes agressores do sistema (NETO et al., 2009). Portanto, com o propósito de se avaliar a resposta linfoproliferativa dos animais incluídos no estudo, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo com CFSE. Nesta técnica, à medida que os linfócitos se dividem, metade da CFSE intracelular gera picos de células com fluorescência decrescente em uma escala logarítmica. Com isso, este método apresenta precisão na medição de linfoproliferação, em comparação às técnicas mais tradicionais (LYONS, 2000; SATHIYASEELAN & BALDWIN, 2000).

Os resultados obtidos indicam que após o emagrecimento, os animais passam a apresentar a taxa de linfoproliferação similar ao de animais em escore ideal, ou seja, o déficit imunológico na proliferação de linfócitos que a obesidade provoca, pode ser revertido com o

emagrecimento. Vale ressaltar que em outras espécies (humanos e modelos de ratos) a obesidade tem sido associada à alterações na imunidade e inflamação crônica de baixo grau (NIEMAN et al., 1999; SAMARTÍN & CHANDRA, 2001; BERG & SCHERER, 2005; TAKEMURA et al., 2007; DE ROSA et al., 2015).

Dados obtidos a partir de estudos como o de Takemura et al. (2007) em ratos, corroboram a ideia de que a redução na gordura corporal de animais obesos permite melhora nas características de linfoproliferação, ou seja, animais magros apresentam maior proliferação das células da medula óssea que dão origem aos linfócitos e macrófagos.

Segundo Ceddia (2005), filhotes de cães obesos podem apresentar risco aumentado de complicações sérias do vírus da cinomose. Por outro lado, a restrição energética leve e a manutenção de um adequado ECC (4-5) podem retardar o declínio relacionado à idade na função celular imune em cães (GREELEY et al. 2006). Cães que mantiveram o ECC ideal (média de 4,6) neste estudo, apresentaram menor declínio relacionado à idade na resposta linfoproliferativa a mitógenos e menor declínio relacionado à idade na contagem total de linfócitos (populações de células T, CD-4 e CD- 8) em comparação com cães que mantiveram ECC condizente ao sobrepeso (média de 6,7).

Van de Velde et al. (2012) observaram que o ganho de peso e aumento do ECC foram acompanhados por concentrações mais altas de leptina, aumento de IgA e IgM, aumento do número de linfócitos e maior resposta à estimulação mitogênica das células mononucleares do sangue periférico *in vitro*. No entanto, quando a resposta imune foi avaliada em condição obesa estável, nenhuma alteração nas funções imunes, nem inflamação sistêmica de baixo grau foi observada pelos mesmos autores (VAN de VELDE et al., 2013).

Apesar do estudo de Van de Velde et al. (2013) não ter observado alteração nas funções imunes, ponderações devem ser realizadas e os resultados encontrados são interessantes de serem discutidos. Nesse trabalho, Van de Velde et al. (2013) induziram a obesidade em oito cães beagle adultos saudáveis por um período de ganho de peso de 47 semanas, seguido de um período de 26 semanas de obesidade estável. Concentração de leptina sérica e citocinas inflamatórias, funcionalidade de linfócitos e atividade fagocitária de neutrófilos e monócitos foram avaliadas em dez intervalos de tempo. A concentração de leptina no soro elevou-se durante o período de ganho de peso, mas apresentou redução durante o período de obesidade estável. Além disso, segundo Van de Velde et al. (2013) no final do ganho de peso, em longo prazo, observou-se diminuição da proliferação de linfócitos T, ou seja, similar aos resultados de nosso estudo, mas esta alteração pareceu ser transitória após a estabilização do peso corporal.

Esse achado pode implicar na confirmação de resposta imune alterada em cães com diferentes equilíbrios energéticos.

Os resultados encontrados em nosso estudo não se referem aos de animais com obesidade induzida e, por se tratarem de animais de tutores, os cães além de estarem na condição obesa há mais de dois anos, apresentavam consumo superior a sua necessidade energética de manutenção, quando foram avaliados no início do estudo, ou seja, estavam em balanço energético positivo e consequente ganho de peso. Desta maneira, nossos resultados associados aos de Van de Velde et al. (2013) sugerem que a alteração no balanço energético durante o início da obesidade (tornar-se obeso versus ser obeso), induz função imunitária deficiente de linfócitos, que pode ser corrigida com a estabilização do ganho de peso e principalmente com o emagrecimento.

Desta maneira, os adipócitos integrantes de um tecido endócrino ativo, através da expressão gênica e secreção de uma série de citocinas atuantes na imunoinflamação, por meio da maior secreção de determinadas citocinas e inflamação crônica de baixo grau, atuam sobre o cérebro, tecidos periféricos e células do sistema imunológico (MATARESE & LA CAVA, 2004; HOTAMISLIGIL, 2005; TRAYHURN, 2005; GERMAN et al., 2010; WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005). A Figura 19 esquematiza os resultados obtidos no presente estudo numa tentativa de associar a relação entre obesidade, citocinas inflamatórias e seus efeitos no sistema imunológico, já discutidos.

Figura 19 - Relação entre obesidade, citocinas inflamatórias e seus efeitos no sistema imunológico.

Fonte: VENDRAMINI, T.H.A (2019).

8 CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente estudo, foi possível concluir que:

- Cães obesos apresentam aumento da expressão gênica de resistina em células do sangue e, o emagrecimento diminuiu a expressão deste marcador;
- A obesidade também resultou no aumento da expressão gênica de IL-8 e a perda de peso reduziu a sua expressão;
- Animais com maior massa gorda corporal apresentaram maior expressão gênica de adiponectina e o programa de perda de peso resultou em redução expressão desta molécula;

- Cães obesos apresentam menor taxa de linfoproliferação do que cães em condição corporal ideal e, a perda de peso reverteu essa alteração;
- O primer desenhado e testado para avaliação da expressão de resistina apresentou resposta satisfatória, com base em resultados encontrados na literatura, para outras espécies, em relação as sequências de primers para avaliação de leptina, interleucina-6 e interleucina-10, estas não foram satisfatórias;
- O alimento empregado bem como o protocolo de perda de peso instituído no estudo, resultaram em respostas satisfatórias, com base na taxa de perda de peso semanal dos cães, composição corporal e manutenção das variáveis bioquímicas.

9 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 6º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.

ACHILIKE, I.; HAZUDA H. P.; FOWLER, S. P.; AUNG, K.; LORENZO, C. Predicting the development of the metabolically healthy obese phenotype. **International Journal of Obesity**, v. 39, p. 228-234, 2014.

AGUILAR-SALINAS, C. A.; GARCIA, E. G., ROBLES, L.; RIANO, D.; RUIZ-GOMEZ, D. G.; GARCIA-ULLOA, A. C.; MELGAREJO, M. A.; ZAMORA, M., GUILLEN-PINEDA, L. E.; MEHTA, R.; CANIZALES-QUINTEROS, S.; TUSIE LUNA M. T.; GÓMEZ-PÉREZ, F. J. High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93(10), p. 4075–4079, 2008.

AGUILAR-VALLES A.; INOUE, W.; RUMMEL, C.; LUHESHI, G. N. Obesity, adipokines and neuroinflammation. **Neuropharmacology**, v. 96, p. 124-134, 2015.

AINSWORTH, D. M., WAGNER, B., FRANCHINI, M.; GRÜNIG, G.; ERB, H. N.; TAN J. Y. Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67(4), p. 669-677, 2006.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19(6), p. 716-723, 1974.

AZEVEDO, I. M.; PINHEIRO, L. A. M.; TORRES, C. A.; SILVA, M. A. S.; GROSSI, T. R. M.; FILHO, I. A.; REGO, A. C. M.; MEDEIROS, V. B.; CARVALHO, M. D. F.; MEDEIRO, A. C. Effects of perntoxifylline in the treatment of abdominal sepsis in rats. **Journal of Surgical and Clinical Research**, v. 1, p. 33-45, 2007.

BACH, J. F.; ROZANSKI, E. A.; BEDENICE, D.; CHAN, D. L.; FREEMAN, L. M.; LOFGREN, J. L.; OURA, T. J.; HOFFMAN, A. M. Association of expiratory airway

dysfunction with marked obesity in healthy adult dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 670- 675, 2007.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. **The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity Related Inflammatory Diseases**. Mediators of Inflammation. 2010.

BASTIEN, B. C.; PATIL, A.; SATYARAJ., E. The impact of weight loss on circulating cytokines in Beagle dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, p. 174–182, 2015.

BEAVERS, K. M.; BRINKLEY, T. E.; NICKLAS, B. J. Effect of exercise training on chronic inflammation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 785-793, 2010.

BENJAMIM, C.F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 34, p. 18-26, 2001.

BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 96, p. 939-949, 2005.

BERGMAN, R. N.; KIM, S. P.; CATALANO, K. J.; HSU, I. R.; CHIU, J. D.; KABIR, M.; HUCKING, K.; ADER, M. Why Visceral Fat is Bad: Mechanisms of the Metabolic Syndrome. **Obesity**, v. 14, p. 16-19, 2006.

BJORNVAD, C. R.; RAND, J. S.; TAN, H. Y.; JENSEN, K. S.; ROSE, F. J.; ARMSTRONG, P. J.; WHITEHEAD, J. P. Obesity and sex influence insulin resistance and total and multimer adiponectin levels in adult neutered domestic shorthair client-owned cats. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 47, p. 55–64, 2014.

BROWN, D. C., CONZEMIUS, M. G., SHOFER, F. S. Body weight as a predisposing factor for humeral condylar fractures, cranial cruciate rupture and intervertebral disc disease in Cocker Spaniels. **Veterinary Compendium Orthopedic**, v. 9, p. 75-78, 1996.

BRUNETTO, M. A. **Perda de peso, indicadores do metabolismo de carboidratos e produção de citocinas em cães**. 95p. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2010.

BRUNETTO, M. A.; NOGUEIRA, S.; SÁ, F. C.; PEIXOTO, M.; VASCONCELLOS, R. S.; FERRAUDO, A. J.; CARCIOFI, A. C. Correspondência entre obesidade e hiperlipidemia em cães. **Ciência Rural**, v. 41, p. 266-271, 2011a.

BRUNETTO, M. A.; PEREIRA NETO, G. B.; TORTOLA, L.; PALUMBO, G. R.; JEREMIAS, J. T.; CAMACHO, A. A.; CARCIOFI, A. C. Taxas de perda de peso em cães obesos domiciliados e de canil submetidos a um mesmo protocolo de perda de peso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 26-28, 2008.

BRUNETTO, M. A.; SÁ, F. C.; NOGUEIRA, S. P.; GOMES, M. D. O. S.; PINAREL, A. G.; JEREMIAS, J. T.; PAULA, F. J. A.; CARCIOFI, A. C. The intravenous glucose tolerance and postprandial glucose tests may present different responses in the evaluation of obese dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 194-197, 2011b.

BUFF, P. R.; DODDS, A. C.; MORRISON, C. D.; WHITLEY, N. C.; MC-FADIN, E. L.; DANIEL, J. A.; DJIANE, J.; KEISLER, D. H. Leptin in horses: tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2942–2948, 2002.

BURKHOLDER, W. J. Precision and practicality of methods assessing body composition of dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 23, p. 1–10, 2001.

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

CARCIOFI, A. C.; TAKAKURA, F. S.; DE-OLIVEIRA, L. D.; TESHIMA, E.; JEREMIAS, J. T.; BRUNETTO, M. A.; PRADA, F. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 326-336, 2008.

CARPAGNANO, G. E.; SPANEVELLO, A.; SABATO, R.; DEPALO, A.; PALLADINO, G. P.; BERGANTINO, L.; FOSCHINO BARBARO, M. P. Systemic and airway inflammation in sleep apnea and obesity: the role of ICAM-1 and IL-8. **Translational Research**, v. 155, p. 35–43, 2010.

CEDDIA, R. B. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. **International Journal of Obesity**, v. 29(10), p. 1175-1183, 2005.

CHIKAMUNE, T.; KATAMOTO, H.; OHASHI, F.; SHIMADA, Y. Serum lipid and lipoprotein concentrations in obese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, p. 595–598, 1995.

CHRISTIANSEN, T.; RICHELSEN, B.; BRUUN, J. M. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. **International Journal of Obesity**, v. 29, p. 146-150, 2005.

CIANCIARULLO, M. A.; CECCON, M. E. J.; YAMAMOTO, L.; NEGRO, G. M. B. D.; OKAY, T. S. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, v.18(2), p. 135-147, 2008.

CIORTEA, R.; MIHU, D.; MIHU, C. M. Association between visceral fat, IL-8 and endometrial cancer. **Anticancer Research**, v. 34, p. 379–383, 2014.

CONSIDINE, R. V.; PREMKUMAR, A.; REYNOLDS, J. C.; SEBRING, N. G.; RICKS, M.; SUMNER, A. E. Adiponectin and leptin in African Americans. **Obesity**, v. 16(2), p. 428–434, 2008.

CORADINI, M.; RAND, J. S.; MORTON, J. M.; ARAI, T.; ISHIOKA, K. ; RAWLINGS, J. M. Fat mass, and not diet, has a large effect on postprandial leptin but not on adiponectin concentrations in cats. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 45, p. 79–88, 2013.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Médica Portuguesa**, v. 19(3), p. 251-256, 2006.

CRANE, S. W. Occurrence and management of obesity in companion animals. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, p. 275–282, 1991.

DALMAS, E.; VENTECLEF, N.; CAER, C.; POITOU, C.; CREMER, I.; ARON-WISNEWSKY, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; BAYRY, J.; KAVERI, S. V.; CLÉMENT, K.; ANDRÉ, S.; GUERRE-MILLO, M. T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 β -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 63, p. 1966-1977, 2014.

DAS, T.; SEN, A.; KEMPF, T.; PRAMANIK, S. R.; MANDAL, C.; MANDAL, C. Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological conditions. **Biochemical Journal**, v. 373, p. 345–355, 2003.

DEGAWA-YAMAUCHI, M.; BOVENKERK, J. E.; JULIAR, B. E.; WATSON, W.; KERR, K.; JONES, R.; ZHU, Q.; CONSIDINE, R. V. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88(11), p. 5452–5455, 2003.

DEVITO, F. C.; PATRICIO, G. C. F.; RIZZO, M. F. C. I.; PACHECO, P. F.; FLOR, P. B.; BRUNETTO, M. A.; CORTOPASSI, S. R. G. Anestesia e obesidade canina? revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, v. 20, p. 42-52, 2015.

DIEZ, M.; MICHAUX, C.; JEUSETTE, I.; BALDWIN, P.; ISTASSE, L.; BIOURGE, V. (2004) Evaluation of blood parameters in experimental obese beagle dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, p. 166-171, 2004.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, v. 112(6), p. 321-329, 1997.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 11-22, 2004.

EDNEY, A. T. B.; SMITH, P. M. Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 118, p. 391–396, 1986.

EISELE, I.; WOOD, I. S.; GERMAN, A. J.; HUNTER, L.; TRAYHURN, P. Adipokine gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, p. 474-481, 2005.

FABBRINI, E.; CELLA, M.; MCCARTNEY, S. A.; FUCHS, A.; ABUMRAD, N. A.; PIETKA, T. A.; CHEN, Z.; FINCK, B. N.; HAN, D. H.; MAGKOS, F.; CONTE, C.; BRADLEY, D.; FRATERRIGO, G.; EAGON, J. C.; PATTERSON, B. W.; COLONNA, M.; KLEIN, S. Association between specific adipose tissue CD4⁺ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. **Gastroenterology**, v. 145, p. 366–374, 2013.

FAGGIONI, R.; FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. **The FASEB Journal**, v. 15, p. 2565–2571, 2001.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, p. 911–919, 2005.

FASOL, R.; SCHINDLER, M.; SCHUMACHER, B.; SCHLAUDRAFF, K.; HANNES, W.; SEITELBERGER, R.; SCHLOSSER, V. The influence of obesity on perioperative morbidity: retrospective study of 502 aortocoronary bypass operations. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 40, p. 126–129, 1992.

FEDIAF - The European Pet Food Industry Federation. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs**. The European Pet Food Industry Federation, Bruxelles, 2018.

FERRIER, L.; ROBERT, P.; DUMON, H.; MARTIN, L.; NGUYEN, P. Evaluation of body composition in dogs by isotopic dilution using a low-cost technique, Fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1725-1727, 2002.

FONSECA-ALANIZ, M. H., TAKADA, J., ALONSO-VALE, M. I. C., LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, p. 216-229, 2006.

FRANCHINI, M.; GILL, U.; VON FELLEBERG, R.; BRACHER, V. D. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61(11), p. 1369-1374, 2000.

FRANK, L.; MANN, S.; LEVINE, C. B.; CUMMINGS, B. P.; WAKSHLAG, J. J. Increasing body condition score is positively associated interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 in Labrador retrievers. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 167, p. 104–109, 2015.

FRIED, S. K.; BUNKIN, D. A.; GREENBERG, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83(3), p. 847–850, 1998.

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

GAYET, C.; LERAY, V.; SAITO, M.; SILIART, B.; NGUYEN, P. The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ target genes in dogs. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 497-503, 2007.

GERMAN, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1940-1946, 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, p. 4–9, 2010.

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

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

GIUSTIZIERI, M. L.; MASCIA, F.; FREZZOLINI, A.; DE PITÀ, O.; CHINNI, L. M.; GIANNETTI, A.; GIROLOMONI, G.; PASTORE, S. Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107(5), p. 871–877, 2001.

GODOY, M. R. C.; SWANSON, K. S. Nutrigenomics: Using gene expression and molecular biology data to understand pet obesity. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 2949–2964, 2013.

GOSSELLIN, J.; WREN, J. A.; SUNDERLAND, S. J. Canine obesity – an overview. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v. 30, p. 1–10, 2007.

GRANT, R.W.; VESTER BOLER, B. M.; RIDGE, T. K.; GRAVES, T. K.; SWANSON, K. S. Adipose tissue transcriptome changes during obesity development in female dogs. **Physiological Genomics**, v. 43, p. 295–307, 2011.

GREELEY, E. H.; SPITZNAGEL, E.; LAWLER, D. F.; KEALY, R. D.; SEGRE, M. Modulation of canine immunosenescence by life-long caloric restriction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111(3–4), p. 287–299, 2006

GUIMARÃES D. E. D.; SARDINHA, F. L. C.; MIZURINI, D. M.; TAVARES DO CARMO, M. G. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, v. 20(5), p. 549–559, 2007.

HAND, M. S.; ARMSTRONG, P. J.; ALLEN, T. A. Obesity: occurrence, treatment, and prevention. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 19, p. 447–474, 1989.

HENDRICKS, J. C. Brachycephalic airway syndrome. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 22, p. 145–1153, 1992.

HERMSDORFF, H. H. M.; JOSEFINA MONTEIRO, J. B. R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48(6), p. 803–811, 2004.

HESHKA, J. T.; JONES, P. J. A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. **Life Sciences**, v. 69, p. 987–1003, 2001.

HOENIG, M.; THOMASETH, K.; WALDRON, M.; FERGUSON, D. C. Insulin sensitivity, fat distribution, and adipocytokine response to different diets in lean and obese cats before and after weight loss. **The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, p. 227–234, 2007.

HOPKINS, T. A.; OUCHI, N.; SHIBATA, R.; WALSH, K. Adiponectin actions in the cardiovascular system, **Cardiovascular Research**, v. 74, p. 11–18, 2007.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p. 860-867, 2006.

HU, E., LIANG, P., SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 697–703, 1996.

ISHIOKA, K.; HOSOYA, K.; KITAGAWA, H.; SHIBATA, H.; HONJOH, T.; KIMURA, K.; SAITO, M. Plasma leptin concentration in dogs: Effects of body condition score, age, gender and breeds. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 11–15, 2007.

ISHIOKA, K.; OMACHI, A.; SASAKI, N.; KIMURA, K.; SAITO, M. Feline adiponectin: molecular structures and plasma concentrations in obese cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, p. 189–194, 2009.

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, p. 349–353, 2002.

JAGANNATHAN-BOGDAN, M.; MCDONNELL, M. E.; SHIN, H.; REHMAN, Q.; HASTURK, H.; APOVIAN, C. M.; NIKOLAJCZYK, B. S. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. **Journal of Immunology**, v. 186, p. 1162–1172, 2011.

JANEWAY, C. A., JR., TRAVERS, P., WALPORT, M., CAPRA, J. D. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. New York: Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, 1999. 180 p.

JANKE, J.; ENGELI, S.; GORZELNIAK, K.; LUFT, C. F.; SHARMA, A. M. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. **Obesity Research**, v. 10(1), p. 1-5, 2002.

JASO-FRIEDMANN, L.; LEARY III, J. H.; PRAVEEN, K.; WALDRON, M.; HOENIG, M. The effects of obesity and fatty acids on the feline immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122, p. 146–152, 2008.

JEREMIAS, J. T.; VENDRAMINI, T. H. A.; RODRIGUES, R. B. A.; PERINI, M. P.; PEDRINELLI, V.; TEIXEIRA, F. A.; BRUNETTO, M. A.; PONTIERI, C. F. F. (submetido)

Markers of inflammation and insulin resistance in dogs before and after weight loss versus lean healthy dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2019.

JEUSETTE, J.; DETILLEUX, J. D.; SHIBATA, H.; SAITO, M.; HONJOH, T.; DELOBEL, A.; ISTASSE, L.; DIEZ, M. Effects of chronic obesity and weight loss on plasma gherlin and leptin concentrations in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 169–175, 2005.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. K.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6 ed., San Diego: Academic Press, 928p, 2008.

KARELIS, A. D. Metabolically healthy but obese individuals. **The Lancet**, v. 372, p. 1281–1283, 2008b.

KARELIS, A. D.; RABASA-LHORET, R. Inclusion of C-reactive protein in the identification of metabolically healthy but obese (MHO) individuals. **Diabetes and Metabolism**, v. 34(2), p.183–184, 2008a.

KASER, S.; KASER, A.; SANDHOFER, A.; EBENBICHLER, C. F.; TILG, H.; PATSCH, JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by pro-inflammatory cytokines in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309(2), p. 286-290, 2003.

KEALY, R. D.; LAWLER D. F.; BALLAM, J. M.; LUST, G.; SMITH, G. K.; BIERY, D. N.; OLSSON, S. E. Five-year longitudinal study on limited food consumption and development of osteoarthritis in coxofemoral joints of dogs. **Journal of the American Veterinary Association**, v. 210, p. 222-225, 1997.

KEALY, R. D.; LAWLER, D. F.; BALLAM, J. M.; MANTZ, S. L.; BIERY, D. N.; GREELEY, E. H.; LIST, G.; SEGRE, M.; SMITH, G. K.; STOWE, H. D. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, p. 1315–1320, 2002.

KEALY, R. D.; LAWLER, D. F.; BALLAM, J. M.; LUST, G.; BIERY, D. N.; SMITH, G. K.; MANTZ, S. L. Evaluation of the effect of limited food consumption on radiographic evidence of osteoarthritis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, p. 1678-1680, 2000.

KERSHAW, E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 2548-2556, 2004.

KHAODHIAR, L.; LING, P. R.; BLACKBURN, G. L.; BISTRAN, B. R. Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 6, p. 410–415, 2004.

KIM, H. Y.; CHOI, J. H.; KANG, Y. J.; PARK, S. Y.; CHOI, H. C.; KIM, H. S. Reparixin, an inhibitor of CXCR1 and CXCR2 receptor activation, attenuates blood pressure and hypertension-related mediators expression in spontaneously hypertensive rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34(1), p. 120-127, 2011.

KOERNER, A. Adipocytokines: leptin – the classical, resistin – the controversial, adiponectin – the promising, and more to come. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, p. 525–546, 2005.

LAFLAMME, D. P. Companion Animals Symposium: obesity in dogs and cats: What is wrong with being fat? **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 1653-1662, 2012.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. **Canine Practice**, v. 22(3), p. 10- 15, 1997a.

LAFLAMME, D. P.; KUHLMAN, G.; LAWLER, D. F. Evaluation of weight loss protocols for dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 33, p. 253-259, 1997b.

LAFONTAN, M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 119–146, 2005.

LAZAR, M. A. Resistin- and obesity-associated metabolic diseases. **Hormone and Metabolic Research**, v. 39, p. 710–716, 2007.

LAZAR, M. A. The humoral side of insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 12, p. 43–44, 2006.

LEE, C. T.; HARRIS, S. B.; RETNAKARAN, R.; GERSTEIN, H. C.; PERKINS, B. A.; ZINMAN, B.; HANLEY, A. J. White blood cell subtypes, insulin resistance and beta-cell dysfunction in high-risk individuals: the PROMISE cohort. **Clinical Endocrinology**, v. 81, p. 536-541, 2014.

LINDER, D. E.; FREEMAN, L. M.; MORRIS, P.; GERMAN, A. J.; BIOURGE, V.; HEINZE, C.; ALEXANDER, L. Theoretical evaluation of risk for nutritional deficiency with caloric restriction in dogs. **The Veterinary Quarterly**, v. 9, p. 123–129, 2012.

LINDER, D. E.; FREEMAN, L. M.; HOLDEN, S. L.; BIOURGE, V.; GERMAN, A. J. Status of selected nutrients in obese dogs undergoing caloric restriction. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 219, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methods**, v. 25(4), p. 402-408, 2001.

LUND, E. M.; ARMSTRONG, P. J.; KIRK, C. A.; KLAUSNER, J. S. Prevalence and risk factor for obesity in adult cats from private US veterinary practices. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 3, p. 88-96, 2005.

LYONS, A. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 147–154, 2000.

MAO, J.; XIA, Z.; CHEN, J.; YU, J. Prevalence and risk factors for canine obesity surveyed in veterinary practices in Beijing, China. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, p. 438-442, 2013.

MARTIN, L.; SILIART, B.; DUMON, H.; BACKUS, R.; BIOURGE, V.; NGUYEN, P. Leptin, body fat content and energy expenditure in intact and gonadectomized adult cats: a

preliminary study. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 85, p. 189 – 194, 2001.

MASSOCO, C.O. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus da USP, São Paulo, São Paulo, Brasil, 2018.

MATARESE, G.; LA CAVA, A. The intricate interface between immune system and metabolism. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 193–200, 2004.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, p. 1–16, 2010.

MCGREEVY, P. D.; THOMSON, P. C.; PRIDE, C.; FAWCETT, A.; GRASSI, T.; JONES, B. Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. **Veterinary Record**, v. 156(22), p. 695-702, 2005.

MICHEL, K. E.; ANDERSON, W.; CUPP, C.; LAFLAMME, D. P. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy x-ray absorptiometry. **British Journal of Nutrition**, 106, 57–59, 2011.

MICHEL, K. E. **Nutritional management of body weight**. In: FASCETTI, A. J.; DELANEY, S. J. editors. Applied veterinary clinical nutrition. Chichester (United Kingdom): Wiley-Blackwell, 109-124, 2012.

MILNER, J. J.; BECK, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, p. 298-306, 2012.

MONTOYA-ALONSO, J. A.; BAUTISTA-CASTAÑO, I.; PEÑA, C.; SUÁREZ, L. M.; JUSTE, C.; TVARIJONAVICIUTE, A. Prevalence of canine Obesity, Obesity-related Metabolic Dysfunction, and relationship with Owner Obesity in an Obesogenic region of Spain. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 59-65, 2017.

MOON, B.; KWAN, J. J.; DUDDY, N.; SWEENEY, G.; BEGUM, N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 285, p. 106–115, 2006.

MORETTA, A.; BOTTINO, C.; MINGARI, M. C.; BIASSONI, R.; MORETTA, L. What is a natural killer cell? **Nature Immunology**, v. 3, p. 6-8, 2002.

MORIGUCHI, S.; KATO, M.; SAKAI, K.; YAMAMOTO, S.; SHIMIZU, E. Exercise training restores decreased cellular immune functions in obese Zucker rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, p. 311-317, 1998.

MORRISON, J. A.; GLUECK, C. J.; DANIELS, S.; WANG, P.; HORN, P.; STROOP, D. Paradoxically high adiponectin and the healthy obese phenotype in obese black and white 16-year-old girls. **Translational Research**, v. 156(5), p. 302–308, 2010.

MOULIN, C. M.; MARGUTI, I.; PERON, J. P.; RIZZO, L. V.; HALPERN, A. Impact of adiposity on immunological parameters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 183-189, 2009.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **Journal of Endocrinology**, v. 222(3), p. 113-127, 2014.

MUKAIDA, N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. **Am. Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 284, p. 566-577, 2003.

MURANAKA, S.; MORI, N.; HATANO, Y.; SAITO, T. R.; LEE, P.; KOJIMA, M.; KIGURE, M.; YAGISHITA, M.; ARAI, T. Obesity induced changes to plasma adiponectin concentration and cholesterol lipoprotein composition profile in cats. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 358–361, 2011.

NAKAMURA, K.; FUSTER, J. J.; WALSH, K. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. **Journal of Cardiology**, v. 63, p. 250-259, 2014.

NEUDER, L. E.; KEENER, J. M.; ECKERT, R. E.; TRUJILLO J. C.; JONES S. L. Role of p38 MAPK in LPS induced pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in equine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 192-199, 2009.

NIEMAN, D. C.; HENSON, D. A.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L.; EKKENS, M.; UTTER, A. C. Influence of obesity on immune function. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 294 – 299, 1999.

NIETO, J. E.; MACDONALD, M. H.; BRAIM, A. E.; ALEMAN, M. Effect of lipopolysaccharide infusion on gene expression of inflammatory cytokines in normal horses in vivo. **Equine Veterinary Journal**, v. 41(7), p.717-719, 2009.

NIH - NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Health implications of obesity: National Institutes of Health consensus development conference statement. **Annals of Internal Medicine**, v. 103(6), p. 1073–1077, 1985.

NIKOLAJCZYK, B. S.; JAGANNATHAN-BOGDAN, M.; DENIS, G. V. The outliers become a stampede as immunometabolism reaches a tipping point. **Immunological Reviews**, v. 249, p. 253–275, 2012.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL, NRC. **Nutrient requirements of dogs**. Washington: National Academy Press, 398p, 2006.

OGAWA, Y.; MASUZAKI, H.; HOSODA, K.; AIZAWA-ABE, M.; SUGA, J.; SUDA, M.; EBIHARA, K.; IWAI, H.; MATSUOKA, N.; SATOH, N.; ODAKA, H.; KASUGA, H.; FUJISAWA, Y.; INOUE, G.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y.; NAKAO, K. Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. **Diabetes**, v. 48(9), p. 1822-1829, 1999.

OHASHI, K.; SHIBATA, R.; MUROHARA, T.; OUCHI, N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, p. 348-355, 2014.

OHMORI, R.; MOMIYAMA, Y.; KATO, R.; TANIGUCHI, H.; OGURA, M.; AYAORI, M.; NAKAMURA, H.; OHSUZU, F. Associations between serum resistin levels and insulin resistance. **Journal of American College of Cardiology**, v.46(2), p.379-380, 2005.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, T. S. A.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Obesity and overweight**. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>, 2017.

O'ROURKE, R. W.; LUMENG, C. N. Obesity heats up adipose tissue lymphocytes **Gastroenterology**, v. 145, p. 282-285, 2013.

OSTO, M.; LUTZ, T. A. Translational value of animal models of obesity – Focus on dogs and cats. **European Journal of Pharmacology**, p. 759, v. 240-252, 2015.

OUCHI, N.; KIHARA, S.; ARITA, Y.; OKAMOTO, Y.; MAEDA, K.; KURIYAMA, H.; HOTTA, K.; NISHIDA, M.; TAKAHASHI, M.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; YAMASHITA, S.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. **Circulation**, v. 102, p. 1296–1301, 2000.

OUCHI, N.; KIHARA, S.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y.; WALSH, K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, p. 561-566, 2003.

OZATA, M., OZDEMIR, L. C.; LICINIO, J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin of leptin mediated defects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, p. 3686–3695, 1999.

PAINTER, S. D.; OVSYANNIKOVAA, I. G.; POLAND, G. A. The weight of obesity on the human immune response to vaccination. **Vaccine**, v. 33, p. 4422-4429, 2015.

PANG, S.; LE, Y. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. **Cellular & Molecular Immunology is a Bimonthly**, v.3(1), p. 29-34, 2006.

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, p. 113, 2014.

PEREIRA-NETO, G. B.; BRUNETTO, M. A.; CHAMPION, T., ORTIZ, E., CARCIOFI, A. C.; CAMACHO, A. A. Avaliação da pressão arterial sistêmica em cães obesos: comparação entre os métodos oscilométrico e doppler ultrassônico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 87-91, 2014.

PEREIRA-NETO, G. B.; BRUNETTO, M. A.; SOUSA, MARLOS G.; CARCIOFI, A. C.; CAMACHO, A. A. Effects of weight loss on the cardiac parameters of obese dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 167-171, 2010.

PEREIRA-NETO, G. B., BRUNETTO, M. A., OBA, P. M., CHAMPION, T., VILLAVERDE, C., VENDRAMINI, T. H. A., BALIEIRO, J. C. C., CARCIOFI, A. C. ; CAMACHO, A. A. Weight loss improves arterial blood gases and respiratory parameters in obese dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, p. 1743-1748, 2018.

PETROSKI, E. L. **Desenvolvimento e validação de equações generalizadas para a estimativa da densidade corporal em adultos**. Santa Maria, 124p. Tese (doutorado), Ciência do Movimento Humano, Universidade Federal de Santa Maria, 1995.

PIANTEDOSI, D., DI LORIA, A., GUCCIONE, J., DE ROSA, A., FABBRI, S., CORTESE, L., CARTA, S., CIARAMELLA, P. Serum biochemistry profile, inflammatory cytokines, adipokines and cardiovascular findings in obese dogs, **The Veterinary Journal**, v. 216, p. 72-78, 2016.

PLOTKIN, B. J.; PAULSON, D.; CHELICH, A.; JURAK, D.; COLE, J.; KASIMOS, J.; BURDICK, J. R.; CASTEEL, N. Immune responsiveness in a rat model for type II diabetes (Zucker rat, fa/fa): susceptibility to *Candida albicans* infection and leucocyte function. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, p. 277–283, 1996.

PORSANI, M. Y. H.; BRUNETTO, M. A. **Obesidade canina: um estudo de prevalência no município de São Paulo – SP**, 2018 (Tese de doutorado em fase de conclusão, dados ainda não publicados).

PRIMEAU, V.; CODERRE, L.; KARELIS, A. D.; BROCHU, M.; LAVOIE, M. E.; MESSIER, V.; SLADEK, R.; RABASA-LHORET, R. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. **International Journal of Obesity**, v. 35(7), p. 971– 81, 2011.

PROCACCINI, C.; DE ROSA, V.; GALGANI, M.; CARBONE, F.; LA ROCCA, C.; FORMISANO, L.; MATARESE, G. Role of adipokines signaling in the modulation of T cells function. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 332, 2013.

PUOANE, T.; STEYN, K.; BRADSHAW, D.; LAUBSCHER, R.; FOURIE, J.; LAMBERT, V.; MBANANGA, N. Obesity in South Africa: The South African Demographic and Health Survey. **Obesity Research**, v. 10(10), p. 1038-1048, 2002.

QUIXABEIRA, V. B. L.; SADDI, V. A. A. importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma Revisão da literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, p. 199-202, 2008.

RADIN, M. J.; SHARKEY, L. C.; HOLYCROSS, B. J. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, p. 136–156, 2009.

REILLY, M. P.; IQBAL, N.; SCHUTTA, M.; WOLFE, M. L.; SCALLY, M.; LOCALIO, A. R.; RADER, D. J.; KIMMEL, S. E. Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 89(8), p. 3872–3878, 2004.

ROCHA, I. E.G.M.; VICTOR, E. G., BRAGA, M.C., BARBOSA e SILVA, O., BECKER, M.M.C. Avaliação ecocardiográfica em obesos assintomáticos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 52-58, 2007.

ROSA, V.; GALGANI, M.; SANTOPAULO, M.; COLAMATTEO, A.; LACCETTI, R.; MATARESE, G. Nutritional control of immunity: balancing the metabolic requirements with an appropriate immune function. **Seminars in Immunology**, v. 27, p. 300-309, 2015.

SAGAWA, M. M.; NAKADOMO, F.; HONJOH, T.; ISHIOKA, K.; SAITO, M. Correlation between plasma leptin concentration and body fat content in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 7–10, 2002.

SAMARTÍN, S.; CHANDRA, R. K. Obesity, overnutrition and the immune system. **Nutrition Research**, v. 21, p. 243–262, 2001.

SANCHEZ-MARGALET, V.; MARTIN-ROMERO, C.; SANTOS-ALVAREZ, J.; GOBERNA, R.; NAJIB, S.; GONZALEZ-YANES, C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 133, p. 11-19, 2003.

SANTAGOSTINO, A.; GARBACCIO, G.; PISTORIO, A.; BOLIS, V.; CAMISASCA, G.; PAGLIARO, P.; GIROTTO, M. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. **Haematologica**, v. 84, p. 499-504, 1999.

SATHIYASEELAN, T.; BALDWIN, C. Evaluation of cell proliferation by bovine T cells in polyclonally activated cultures using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) loading and flow cytometric analysis. **Research in Veterinary Science**, v. 69, p. 275–281, 2000.

SEAMAN, W. E. Natural killer cells and natural killer T cells. **Arthritis Rheumatology**, v. 43, p. 1204–1217, 2000.

SIGAL, L. H.; RON, Y. **Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences**, New York: McGraw-Hill, 1994. 805 p.

SÖDER, J.; HAGMAN, R.; DICKSVED, J.; LINDÅSE, S.; MALMLOF, K.; AGBACK, P.; MOAZZAMI, A.; HOGLUND, K.; WERNERSSON, S. The urine metabolome differs between lean and overweight Labrador Retriever dogs during a feed-challenge. **Plos One**, v. 12, p. e0180086, 2017.

STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; BROWN, E. J.; BANERJEE, R. R.; WRIGHT, C. M.; PATEL, H. R.; AHIMA, R. S.; LAZAR, M. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, p. 307–312, 2001.

TAKAKURA, F. S. **Estudo de fontes de amido para alimentos extrusados para cães**. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2003. 108p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003.

TAKASHIMA, S.; NISHII, N.; KATO, A.; MATSUBARA, T.; SHIBATA, S.; KITAGAWA, H. Molecular cloning of feline resistin and the expression of resistin, leptin and adiponectin in the adipose tissue of normal and obese cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78(1), p. 23–28, 2016.

TAKEMURA, Y.; OUCHI, N.; SHIBATA, R.; APRAHAMIAN, T.; KIRBER, M.T.; SUMMER, R.S.; KIHARA, S.; WALSH, K. (2007) Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 375-386.

TAMURA, Y.; OHTA, H.; YOKOYAMA, N.; LIM, S. Y.; OSUGA, T.; MORISHITA, K.; NAKAMURA, K.; YAMASAKI, M.; TAKIGUCHI, M. Evaluation of selected cytokine gene expression in colonic mucosa from dogs with idiopathic lymphocytic-plasmacytic colitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, p. 1407-1410, 2014.

TEIXEIRA, F. A.; NOGUEIRA, J. P. S.; DUARTE, C. N.; HALFEN, D. P.; PEDROSA, D. M.; YAMASAKI, E.; SANTOS, J. P. F.; BRUNETTO, M.A. **Percepção dos proprietários quanto ao escore de condição corporal do seu animal de estimação**. In: VIII Simpósio de Pós-graduação e Pesquisa em Nutrição e Produção Animal (VNP-FMVZ/USP), 2014, Pirassununga. Anais do VIII Simpósio de Pós-graduação e Pesquisa em Nutrição e Produção Animal (VNP-FMVZ/USP), p. 1-1, 2014.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews immunology**, v. 6, p. 772-783, 2006.

TIZARD I. **Veterinary Immunology: An Introduction**, 9^o ed. St Louis, Missouri: Elsevier, 2013. 569 p.

TRAYHURN, P. Adipose tissue in obesity – an inflammatory issue. **Endocrinology**, v. 146, p. 1003–1005, 2005.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Signalling Role of Adipose Tissue: Adipokines and Inflammation in Obesity. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 1078-108, 2005.

TROPF, M.; NELSON, O. L.; LEE, P. M.; WENG, H. Y. Cardiac and metabolic variables in obese dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, p. 1000-1007, 2017.

TRØSEID, M.; LAPPEGÅRD, K. T.; CLAUDI, T.; DAMÅS, J. K.; MØRKRID, L.; BRENDBERG, R.; MOLLNES, T. E. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. **European Heart Journal**, v. 25, p. 349-355, 2004.

TRUJILLO, M. E.; SCHERER, P. E. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. **Endocrine Reviews**, v. 27, p. 762–778, 2006.

TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J. J.; HOLDEN, S. L.; MORRIS, P. J.; BIOURGE, V.; GERMAN, A. J. Effects of weight loss in obese cats on biochemical analytes related to inflammation and glucose homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 42, p. 129–141, 2012a.

TVARIJONAVICIUTE, A.; TECLES, F.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; CERON, J. J. Effect of weight loss on inflammatory biomarkers in obese dogs. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 570-572, 2012b.

USUI, S.; YASUDA, H.; KOKETSU, Y. Characteristics of obese or overweight dogs visiting private Japanese veterinary clinics. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, p. 338–343, 2016.

UTHAISANGSOOK, S.; DAY, N. K.; BAHNA, S. L. GOOD, R. A.; HARAGUCHI, S. Innate immunity and its role against infections. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 88, n. 3, p. 253-264, 2002.

VAN BEEK, L.; LIPS, M. A.; VISSER, A.; PIJL, H.; IOAN-FACSINAY, A.; TOES, R.; BERENDS, F. J.; WILLEMS VAN DIJK, K.; KONING, F.; VAN HARMELEN, V. Increased systemic and adipose tissue inflammation differentiates obese women with T2DM from obese women with normal glucose tolerance. **Metabolism**, v. 63, p. 492–501, 2014.

VAN DE VELDE, H.; JANSSENS, G. P.; ROCHUS, K.; DUCHATEAU, L.; SCHAREK-TEDIN, L.; ZENTEK, J.; NGUYEN, P.; COX, E.; BUYSE, J.; BIOURGE, V.; HESTA, M. Proliferation capacity of Tlymphocytes is affected transiently after a long-term weight gain in Beagle dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, p. 237–244, 2013

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

VAN DER POLL, T. Immunotherapy of sepsis. **Infectious Diseases**, v. 1, p. 165-174, 2001.

VAN DER POLL, T.; VAN DEVENTER, S. J. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 13(2), p. 413-426, 1999.

VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annual Review of Immunology**, v. 8, p. 253-78, 1990.

VIEIRA-POTTER, V. J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues **Cellular Microbiology**, v. 16(10), p. 1484-1492, 2014.

VILLELA, N. B.; NETO, O. B.; CURVELLO, K. L.; PANEILI, B. E.; SEAL, C.; SANTOS, D. T.; CRUZ, T. Quality of life of obese patients submitted to bariatric surgery. **Nutrición Hospitalaria**, v. 19(6), p. 367-371, 2004.

VITGER, A. D.; STALLKNECHTB, B. M.; MILESA, J. E.; HANSENC, S. L.; VEGGED, A.; BJØRNVADA, C. R. Immunometabolic parameters in overweight dogs during weight loss with or without an exercise program. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 59, p. 58–66, 2017.

WAGNER, N. M.; BRANDHORST, G.; CZEPLUCH, F.; LANKEIT, M.; EBERLE, C.; HERZBERG, S.; FAUSTIN, V.; RIGGERT, J.; OELLERICH, M.; HASENFUSS, G.; KONSTANTINIDES, S.; SCHÄFER, K. Circulating regulatory T cells are reduced in obesity and may identify subjects at increased metabolic and cardiovascular risk. **Obesity**, v. 21, p. 461–468, 2013.

WEETH, L. P. Other Risks/Possible Benefits of Obesity. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46(5), p. 843-853, 2016.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, 2005.

WERNSTEDT ASTERHOLM, I.; TAO, C.; MORLEY, T. S.; WANG, Q. A.; DELGADO-LOPEZ, F.; WANG, Z. V.; SCHERER, P. E. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. **Cell Metabolism**, v. 20, p. 103-118, 2014.

WITZELA, A. L.; KIRKA, C. A.; KANIAB, S. A.; BARTGESA, J. W.; BOSTONC, R. C.; MOYERSA, T.; BYRDA, H.; LAUTENA, S. Relationship of adiponectin and its multimers to metabolic indices in cats during weight change. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 53, p. 70–77, 2015.

WOLF, A. M.; WOLF, D.; RUMPOLD, H.; ENRICH, B.; TILG, H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 630–635, 2004.

WOODMAN, L.; SUTCLIFFE, A.; KAUR, D.; BERRY, M.; BRADDING, P.; PAVORD, I. D.; BRIGHTLING, C. E. Chemokine concentrations and mast cell chemotactic activity in BAL fluid in patients with eosinophilic bronchitis and asthma, and in normal control subjects. **Chest** v. 130(2), p. 371-378, 2006.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; MINOKOSHI, Y.; ITO, Y.; WAKI, H.; UCHIDA, S.; YAMASHITA, S.; NODA, M.; KITA, S.; UEKI, K.; ETO, K.; AKANUMA, Y.; FROGUEL, P.; FOUFELLE, F.; FERRE, P.; CARLING, D.; KIMURA, S.; NAGAI, R.; KAHN, B. B.; KADOWAKI, T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation b activating AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine**, v. 8(11), p. 1288-1295, 2002.

YOKOTA, T.; MEKA, C. S.; KOURO, T.; MEDINA, K. L.; IGARASHI, H.; TAKAHASHI, M.; ORITANI, K.; FUNAHASHI, T.; TOMIYAMA, Y.; MATSUZAWA, Y.; KINCADE, P.W. Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 5091-5099, 2003.

YOKOTA, T.; ORITANI, K.; TAKAHASHI, I.; ISHIKAWA, J.; MATSUYAMA, A.; OUCHI, N.; KIHARA, S.; FUNAHASHI, T.; TENNER, A. J.; TOMIYAMA, Y.; MATSUZAWA, Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. **Blood**, v. 96, p. 1723-1732, 2000.

ZHAO, Y.; SUN, R.; YOU, L.; GAO, C.; TIAN, Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, p. 247–252, 2003.

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

Apêndice 1 - Quantificação e qualidade do RNA das amostras avaliadas.

Animal	Quantidade de RNA ng/ml ou ug/ml		Relação 260nm/280nm (qualidade de 1,8 a 2,0)
	Leitura 1	Leitura 2	
A	20,36	20,34	1,93
B	13,76	13,66	1,80
C	45,23	42,14	1,98
D	16,9	19,44	1,88
E	66,36	65,53	1,97
F	64,92	-	1,89
G	34,14	44,70	2,078
H	62,42	-	2,035
I	57,97	56,30	1,941
J	58,02	52,24	1,89
K	5,84	8,81	2,26
L	35,48	36,83	1,99
M	23,88	21,56	1,83
N	16,39	16,78	1,94
O	21,38	-	1,71
P	12,28	12,64	1,69
A ¹	16,41	16,96	1,90
B ¹	43,64	45,31	1,88
C ¹	10,16	10,923	1,69
D ¹	16,74	10,354	1,67
E ¹	16,15	-	1,70
F ¹	18,09	17,41	1,69
G ¹	9,23	9,03	1,79
H ¹	15,62	9,55	1,73

¹Mesmos animais do grupo obeso após o emagrecimento.

Apêndice 2 - Exemplos das curvas de amplificação dos primers (A), resistina (B), leptina (C) e IL-10 (D) avaliados por qRT-PCR.

Apêndice 3 - Valores de eritogramas encontrados nos grupos experimentais obesos e controle no início do estudo.

Animal	Eritrócitos (milhões/mm ³)	Eritroblastos (%)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	V.C.M. ¹ (mm ³)	H.C.M. ² (pg)	C.H.C.M. ³ (g/dL ³)	Prot. Plasm. Total ⁴ (g/dL)	Plaquetas (mm ³)
<i>Grupo obeso</i>									
A	7,16	0	52	18,30	72,80	25,60	35,10	6,60	209.000
B	7,60	0	53	17,30	69,74	22,76	32,64	8,00	248.000
C	7,00	0	49	16,30	70,00	23,29	33,27	7,80	239.000
D	7,60	0	53	17,00	69,74	22,63	32,45	7,40	270.000
E	7,60	0	53	17,60	69,74	14,30	23,16	7,60	246.000
F	7,00	0	49	16,30	70,00	23,29	33,27	8,40	277.000
G	7,00	0	47	16,50	67,14	23,57	35,11	8,40	110.000
H	7,60	0	50	16,80	65,79	22,11	33,60	6,80	417.000
<i>Grupo controle</i>									
I	6,40	0	45	15,00	70,31	23,44	33,33	7,00	258.000
J	8,00	0	53	18,00	66,25	22,50	33,96	7,40	190.000
K	7,20	0	50	16,66	69,44	23,14	33,32	7,00	175.000
L	7,48	0	49	16,30	65,51	21,79	33,27	7,80	223.000
M	6,28	0	42	14,00	66,88	22,29	33,33	7,40	265.000
N	7,12	0	47	16,50	66,01	23,17	35,11	7,80	269.000
O	7,31	0	50	16,10	68,40	22,02	32,20	7,00	373.000
P	6,80	0	51	16,30	75,00	23,97	31,96	8,00	375.000

¹ Volume corpuscular médio.² Hemoglobina corpuscular média.³ Concentração da hemoglobina corpuscular média.⁴ Proteína plasmática total.

Apêndice 4 - Valores de leucogramas encontrados nos grupos experimentais obesos e controle no início do estudo.

Animal	Leucócitos	Bastonetes		Segmentados		Linfócitos		Monócitos		Eosinófilos		Basófilos	
	(mm ³)	(%)	(células/mm ³)	(%)	(células/mm ³)	(%)	(células/mm ³)	(%)	(células/mm ³)	(%)	(células/mm ³)	(%)	(células/mm ³)
<i>Grupo obeso</i>													
A	7.900	0	0	59	4661	28	2212	3	237	10	790	0	0
B	6.100	0	0	45	2745	38	2318	0	0	17	1037	0	0
C	12.400	0	0	42	5208	28	3472	4	496	26	3224	0	0
D	6.000	0	0	70	4200	18	1080	2	120	10	600	0	0
E	7.700	0	0	62	4774	18	1386	0	0	20	1540	0	0
F	10.100	0	0	46	4646	20	2020	4	404	30	3030	0	0
G	12.400	0	0	61	7564	10	1240	4	496	23	2852	2	248
H	9.900	3	297	63	6237	24	2376	6	594	4	396	0	0
<i>Grupo controle</i>													
I	8.100	0	0	62	5022	13	1053	6	486	19	1539	0	0
J	6.900	0	0	38	2622	41	2829	0	0	21	1449	0	0
K	12.000	0	0	49	5880	16	1920	1	120	34	4080	0	0
L	9.300	0	0	47	4371	22	2046	0	0	31	2883	0	0
M	10.900	0	0	60	6540	25	2725	3	327	12	1308	0	0
N	16.100	4	644	38	6118	34	5474	3	483	21	3381	0	0
O	10.000	0	0	51	5100	30	3000	10	1000	9	900	0	0
P	10.700	0	0	46	4922	27	2889	3	321	24	2568	0	0