

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PAOLA CAROLINE DA SILVA NUNES

**Obesidade canina e inflamação: estudo dos microRNAs envolvidos com
a expressão de macrófagos no tecido adiposo**

Pirassununga

2022

PAOLA CAROLINE DA SILVA NUNES

Obesidade canina e inflamação: estudo dos microRNAs envolvidos com a expressão de macrófagos no tecido adiposo

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientadora: Prof. Dra. Deise Carla Almeida Leite Dellova

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N972o Nunes, Paola Caroline da Silva
Obesidade canina e inflamação: estudo dos
microRNAs envolvidos com a expressão de macrófagos
no tecido adiposo / Paola Caroline da Silva Nunes ;
orientadora Deise Carla Almeida Leite Dellova. --
Pirassununga, 2022.
66 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. cães. 2. acúmulo de gordura corporal. 3.
hipertrigliceridemia. 4. miRNAs. 5. biópsia líquida.
I. Leite Dellova, Deise Carla Almeida, orient. II.
Titulo.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
SCAPACADIN/CEUA

Pirassununga, 28 de dezembro de 2021
CEUA N 1940130519
(ID 001686)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Deise Carla Almeida Leite Dellova
Área: Biociência Animal

Título da proposta: "Obesidade canina e inflamação: estudo dos microRNAs envolvidos com a expressão de macrófagos no tecido adiposo".

CERTIFICADO (Emenda versão de 10/setembro/2021)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 10/setembro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Precisamos aumentar o prazo para a conclusão do projeto e o N experimental (de 30 para 32 cadelas) porque: 1) A etapa de marcação imuno-histoquímica (IH) para macrófagos está em andamento. A pandemia pelo coronavírus provocou atrasos no cronograma do projeto, já que as atividades de pesquisa e da UDCH foram interrompidas entre março e novembro de 2020 e março a maio de 2021, sendo retomadas em junho de 2021. 2) Ainda faltam recrutar 2 cadelas para a realização de biópsia do tecido adiposo, uma vez que, entre as 19 cadelas obesas recrutadas, nem todos os tutores autorizaram a realização da biópsia. De acordo com a análise estatística prévia, o N para as biópsias e análises de IH e PCR do tecido adiposo deve ser 12 cadelas obesas versus 6 cadelas controle."

Animais a serem adicionados

Origem: Hospital Veterinário UDCH

Espécie: Cães

sexo: Fêmeas

idade: 3 a 8 anos

N: 2

Linhagem: qualquer raça

Peso: 5 a 70 kg

Nova previsão de término da proposta: **06/2022**

Comentário da CEUA: Esta CEUA/FZEA aprova a emenda do projeto de pesquisa, alterando a data final para 06/2022 e o número de animais de 30 para 32 (cadela).

Prof. Dra. Luciane Silva Martello
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Fabiana Fernandes Bressan
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAOLA CAROLINE DA SILVA NUNES

Obesidade canina e inflamação: estudo dos microRNAs envolvidos com a expressão de macrófagos no tecido adiposo

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data de aprovação: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof(a). Dr.(a)

Prof(a). Dr.(a)

Prof(a). Dr.(a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dra. Deise Carla Almeida Leite Dellova pelos ensinamentos, conselhos, oportunidades, confiança, apoio e dedicação, que foram fundamentais para o meu mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira pela colaboração, apoio e conselhos que foram essenciais para esse trabalho. Agradeço também a colaboração do Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi e do Prof. César Gonçalves de Lima.

Agradeço a M.V Danielle Passarelli pela contribuição na realização dos exames laboratoriais.

Agradeço imensamente também:

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realizar meu mestrado.

Ao hospital veterinário UDCH, ao Laboratório de Análises Clínicas, ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e ao Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT/ZMV), pela infraestrutura e ajuda de todos os funcionários.

Aos meus amigos, que sem eles a execução do projeto seria impossível: Rosane, Camila, Sâmela, Wellington, Mariana, Natália Leite, Natália Bastos e Alessandra.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/26547-0 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Por fim, agradeço meu esposo Artur e minha família, por sempre estarem ao meu lado, incentivando e dando forças para eu conseguir atingir meus objetivos.

RESUMO

NUNES, P. C. S. **Obesidade canina e inflamação: estudo dos microRNAs envolvidos com a expressão de macrófagos no tecido adiposo**. 2022. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

O tecido adiposo é um órgão metabólico e endócrino, tendo seus adipócitos a capacidade de sintetizar e secretar vesículas extracelulares (VEs), permitindo assim a comunicação intercelular. Os microRNAs (miRNAs), presentes no tecido adiposo e nas VEs circulantes, são capazes de regular a expressão gênica. Esse estudo teve como objetivo avaliar as VEs pequenas no soro de cães obesos, além de: 1) investigar a influência da perda de peso sobre o tamanho e concentração dessas vesículas; 2) avaliar a expressão de três miRNAs alvo em VEs pequenas de cadelas obesas; e 3) analisar marcadores de inflamação e uma possível relação entre o estado inflamatório, as VEs séricas e os miRNAs alvos expressos nas VEs séricas e no tecido adiposo de cadelas obesas. O segundo capítulo, demonstrou que as VEs pequenas foram isoladas a partir do sangue total, por meio de centrifugações e ultracentrifugações seriadas, utilizando o equipamento NanoSight para a determinação do tamanho e concentração dessas VEs pequenas presentes no soro de cães com sobrepeso e obesos, antes e após o programa de perda de peso. A redução do peso corporal e do acúmulo de gordura nesses cães, foi acompanhada pela diminuição do tamanho e da concentração das VEs pequenas, sugerindo assim uma redução da atividade secretora do tecido adiposo dos cães, após 4 meses do programa de perda de peso. No terceiro capítulo foi avaliado o tamanho e a concentração de VEs séricas em cadelas obesas, assim como os miRNAs (miR-132, miR-26b e miR-155) contidos nessas VEs. Os miRNAs foram extraídos das VEs pequenas e analisados pela técnica de PCR em tempo real. Uma análise de componentes principais demonstrou que um grupo de cadelas obesas (obeso com alteração) se agrupavam com relação à concentração de VEs pequenas e concentração sérica de triglicérides. Essas cadelas apresentaram maior concentração sérica de triglicérides, maior concentração de VEs pequenas e maior expressão do miR-132 e miR-26b, sugerindo que com a expansão do tecido adiposo, provocada pela obesidade, está ocorrendo maior produção e liberação de VEs, o que provavelmente está influenciando a comunicação intercelular

devido à ação da expressão dos miRNAs contidos nessas VEs pequenas, pois os mesmos parecem estarem envolvidos com metabolismo de lipídios e adipogênese. Finalmente no quarto capítulo, foi avaliado o miR-26b, miR-155 e miR-132 e seus genes alvo (MYCBP, SOCS1 e FOXO3), com o infiltrado de macrófagos e a inflamação no tecido adiposo subcutâneo de cadelas obesas, em comparação com cadelas controle. Os miRNAs foram extraídos das VEs pequenas e do tecido adiposo e analisados pela técnica de PCR em tempo real. A análise da expressão dos genes também foi realizada com a técnica de PCR em tempo real. Nenhuma diferença foi observada em relação aos marcadores de inflamação, infiltrado de macrófagos no tecido adiposo subcutâneo, concentração e tamanho das VEs séricas, expressão dos miRNAs nas VEs e no tecido adiposo subcutâneo e expressão dos genes alvos dos miRNAs no tecido adiposo subcutâneo. Entretanto, observamos que as cadelas obesas apresentaram hipertrofia do tecido adiposo subcutâneo revelando uma alteração na homeostasia desse tecido. Não foram encontradas evidências que comprovassem que o processo inflamatório estava instalado e provavelmente por isso não encontramos alterações nos miRNAs e nos genes alvo avaliados, assim como o número de infiltrado de macrófagos no tecido adiposo subcutâneo. Em suma, esses resultados contribuem para o campo de pesquisa da obesidade canina, visando elucidar o papel das VEs pequenas e de seus miRNAs nessa doença.

Palavras-chave: cães, acúmulo de gordura corporal, hipertrigliceridemia, miRNAs, biópsia líquida.

ABSTRACT

NUNES, P. C. S. **Canine obesity and inflammation: a study of microRNAs involved in the expression of macrophages in adipose tissue.** 2022. 78 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Adipose tissue is a metabolic and endocrine organ, and its adipocytes have the ability to synthesize and secrete extracellular vesicles (EVs), thus allowing intercellular communication. MicroRNAs (miRNAs), present in adipose tissue and circulating EVs, are able to regulate gene expression. This study aimed to evaluate the small EVs in the serum of obese dogs, in addition to: 1) investigating the influence of weight loss on the size and concentration of these vesicles; 2) to evaluate the expression of three target miRNAs in small EVs from obese female dogs; and 3) to analyze markers of inflammation and a possible relationship between inflammatory status, serum EVs and target miRNAs expressed in serum EVs and adipose tissue of obese female dogs. The second chapter demonstrated that small EVs were isolated from whole blood, by means of serial centrifugations and ultracentrifugations, using the NanoSight equipment to determine the size and concentration of these small EVs present in the serum of overweight and obese dogs, before and after the weight loss program. The reduction in body weight and fat accumulation in these dogs was accompanied by a decrease in the size and concentration of small EVs, thus suggesting a reduction in the secretory activity of the dogs' adipose tissue after 4 months of the weight loss program. In the third chapter, the size and concentration of serum EVs in obese female dogs was evaluated, as well as the miRNAs (miR-132, miR-26b and miR-155) contained in these EVs. The miRNAs were extracted from the small EVs and analyzed by the real-time PCR technique. A principal component analysis showed that a group of obese female dogs (obese with alteration) clustered together with higher levels of small EVs and serum triglyceride concentrations. These females had higher serum triglycerides, higher concentration of small EVs and higher expression of miR-132 and miR-26b, suggesting that with the expansion of adipose tissue, caused by obesity, greater production and release of EVs is occurring, which is probably influencing intercellular communication due to the action of the expression of miRNAs contained in these small EVs, as they seem to be involved in lipid metabolism and adipogenesis.

Finally, in the fourth chapter, miR-26b, miR-155 and miR-132 and their target genes (MYCBP, SOCS1 and FOXO3) were evaluated with macrophage infiltrate and inflammation in the subcutaneous adipose tissue of obese female dogs, compared to control females. MiRNAs were extracted from small EVs and adipose tissue and analyzed by real-time PCR. The analysis of gene expression was also performed using the real-time PCR technique. No differences were observed regarding markers of inflammation, macrophage infiltration in subcutaneous adipose tissue, concentration and size of serum EVs, miRNA expression in EVs and subcutaneous adipose tissue, and expression of miRNA target genes in subcutaneous adipose tissue. However, we observed that the obese female dogs presented hypertrophy of the subcutaneous adipose tissue, revealing an alteration in the homeostasis of this tissue. No evidence was found to prove that the inflammatory process was installed and that is probably why we did not find changes in miRNAs and target genes evaluated, as well as the number of macrophages infiltrated in the subcutaneous adipose tissue. In short, these results contribute to the field of research on canine obesity, aiming to elucidate the role of small EVs and their miRNAs in this disease.

Keywords: dogs, accumulation of body fat, hypertriglyceridemia, miRNAs, liquid biopsy

SUMÁRIO / CONTENTS

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS.....	4
CHAPTER 2. SERUM SMALL EXTRACELLULAR VESICLES IN OVERWEIGHT AND OBESE DOGS BEFORE AND AFTER WEIGHT LOSS	7
REFERENCES.....	17
CHAPTER 3. EVALUATION OF CIRCULATING EXTRACELLULAR VESICLES AND THEIR miRNA CONTENTS IN NEUTERED AND OBESE FEMALE DOGS... 	18
1. INTRODUCTION	20
2. RESULTS	21
2.1. Obese female dogs have increased serum triglyceride concentration	21
2.2. Protocol efficiency for sEVs analysis.....	24
2.3. Obese female dogs have a higher concentration of circulating sEVs and higher expression of miR-132 and miR-26b.....	25
3. DISCUSSION	27
4. METHODS.....	29
4.1. Animal model	29
4.2. Experimental groups, sample collection and complementary examinations	30
4.3. Isolation of sEVs	30
4.4. Characterization of sEVs.....	31
4.5. Total RNA extraction, reverse transcription, and Real-Time PCR.....	31
4.6. Statistical analysis.....	32
REFERENCES.....	33
CAPÍTULO 4. MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E ANÁLISE DO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CADELAS OBESAS: microRNAs, MARCAÇÃO PARA MACRÓFAGOS E HISTOMORFOMETRIA.....	36

1. INTRODUÇÃO.....	38
2. METODOLOGIA	40
2.1. Exame físico e exames laboratoriais de triagem.....	41
2.2. Dosagem hormonal e ultrassom	41
2.3. Marcadores de inflamação	42
2.4. Análise das VEs pequenas	42
2.5. Biópsia tecido adiposo subcutâneo.....	43
2.6. Marcação imuno-histoquímica para macrófagos M1 no tecido adiposo.....	44
2.7. Histomorfometria do tecido adiposo subcutâneo	45
2.8. Extração de RNA total, transcriptase reversa e PCR em tempo real	46
2.9. Expressão dos genes MYCBP, SOCS1 e FOXO3 no tecido adiposo.....	47
2.10. Análise dos resultados.....	48
3. RESULTADOS	48
3.1. Exame físico e laboratorial.....	48
3.2. Marcadores Inflamatórios.....	51
3.3. VEs séricas e seus miRNAs.....	52
3.4. Histomorfometria do tecido adiposo subcutâneo	53
3.5. Macrófagos no tecido adiposo	55
3.6. miRNAs e genes alvo no tecido adiposo.....	56
4. DISCUSSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	62

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

A obesidade canina é uma síndrome clínica complexa, de causa multifatorial, com destaque para o balanço energético positivo, fatores genéticos, metabólicos, endócrinos e até mesmo o uso de medicamentos que induzem a ingestão excessiva de alimentos (YAM et al., 2016). *The Global Pet Obesity Initiative*, um consenso entre médicos veterinários, apoiado pela *American Veterinary Medical Association*, propõe que a obesidade canina é uma doença definida pelo aumento de 30% do peso corporal ideal (WARD; GERMAN; CHURCHILL, 2018). Sendo o escore de condição corporal (ECC) o método atual utilizado para determinar a adiposidade, cães com ECC 6 e 7 são classificados em sobrepeso e com ECC 8 e 9, obesos (LAFLAMME, 1997). A população mundial de cães com sobrepeso e obesidade possui uma prevalência em torno de 40% a 50% (PORSANI et al., 2020; GERMAN, 2015; MONTOYA-ALONSO et al., 2017).

A ingestão excessiva de alimentos e o desbalanço entre o consumo e o gasto de energia estão entre as principais causas de obesidade em cães, e seus efeitos adversos incluem hipertensão, alterações no metabolismo lipídico, resistência insulínica, cardiopatias, osteoartrite, distúrbios reprodutivos, doenças respiratórias, alterações urinárias, alguns tipos de câncer, redução da qualidade e da expectativa de vida (MONTOYA-ALONSO et al., 2017; BURNS, 2018; XENOULIS; STEINER, 2010; YAM et al., 2016). Os cães obesos comumente apresentam alterações no lipidograma, caracterizadas pelo aumento na concentração sérica de triglicérides e /ou colesterol (RAFFAN, 2022; JERICÓ et al. 2018; PIANTEDOSI et al., 2016).

Quando ocorre um balanço energético positivo, caracterizado pelo maior consumo e menor gasto de energia, inicia-se o acúmulo de tecido adiposo no subcutâneo e, posteriormente, nas vísceras (IZAOLA et al., 2015). Essa expansão do tecido adiposo ocorre tanto pela produção de novas células de gordura (hiperplasia), quanto pelo aumento do volume das células pré-existentes (hipertrofia) (ARNER; KULYTÉ, 2015) e possivelmente pode alterar a síntese e a liberação de vesículas extracelulares (VEs) por esse tecido. As VEs são nanopartículas sintetizadas por diversas células, incluindo os adipócitos, e secretadas para o meio extracelular, comunicando assim com diversos órgãos, podendo ser classificadas de acordo com sua biogênese da seguinte forma: corpos apoptóticos (1 a 5 µm), microvesículas (100 a 1000 nm) e exossomos (30 a 150 nm) (CAMINO et al., 2020). Devido à dificuldade

em estabelecer exatamente a sua origem, a International Society of Extracellular Vesicles - ISEV também classificou as VEs quanto ao tamanho: VEs pequenas (<200nm) e VEs grandes (>200nm) (THÉRY et al., 2018).

A comunicação intercelular, troca genética e apresentação de antígenos se dá através do conteúdo das VEs: proteínas, lipídios e ácido nucleicos, como mRNA e microRNAs (KIM; SHAH; NAKAMURA, 2018). A presença de VEs em diferentes fluidos corporais e a facilidade em isolá-las, permitiu a análise e a caracterização de seu conteúdo, sendo definidas como biomarcadores pouco invasivos e sua extração como “biópsia líquida” (AGUILERA-ROJAS et al., 2018). Os microRNAs (miRNAs) correspondem a um grupo altamente conservado de pequenos RNAs não codificantes, com aproximadamente 22 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica. Os miRNAs podem reprimir a tradução e/ou iniciar a degradação do mRNA alvo por meio do pareamento de bases em locais complementares dentro de mRNA, controlando, assim, diversos processos biológicos em diferentes tecidos (ARNER; KULYITÉ, 2015; ZHUANG et al., 2012).

Aparentemente, o tecido adiposo é o sítio primário da inflamação associada à obesidade, devido a sua expansão e aumento da atividade secretora. Durante o remodelamento dinâmico ou expansão, o tecido sofre as consequências da hipoperfusão sanguínea e hipóxia, que resultam em uma inflamação local devido à ação das adipocinas inflamatórias e fatores quimiotáticos (VENDRAMINI et al., 2020; GE et al., 2014; IZAOLA et al., 2015). Os macrófagos são as células imunes mais abundantes no tecido adiposo, e estudos sugerem que a obesidade pode aumentar o número e a ativação desses macrófagos, sendo o infiltrado de macrófagos associado à fase mais crônica do processo inflamatório (ZHAO et al., 2022; GUERREIRO; CARVALHO; FREITAS, 2022).

A expressão de diversos miRNAs tem sido avaliada em cães acometidos por neoplasias, doença cardíaca, degeneração de retina e doenças infecciosas (PENSO-DOLFIN et al., 2016). Contudo, são poucos os estudos analisando o papel de miRNAs com a obesidade canina. Estudos envolvendo outras espécies, demonstraram que os miR-132, miR-26b e miR-155 são miRNAs associados com obesidade, metabolismo lipídico, adipogênese, infiltração de macrófagos e inflamação, secreção de insulina, entre outros (EIKELIS et al., 2021; MULDER et al., 2019; KLÖTING et al., 2009). Estudos realizados em humanos, camundongos e cultivo celular observaram que o miR-26b e o miR-132 atuam na adipogênese resultando na diferenciação dos

adipócitos e no acúmulo de triglicérides e, que o miR-155 está associado ao metabolismo lipídico e hepático (SONG et al., 2014; LI et al., 2017; ACHARYA et al., 2019; ZHU et al., 2021).

Sendo assim, quando as cadelas ganham peso espera-se encontrar uma expansão do tecido adiposo com alterações em: 1) tamanho e concentração de VEs; 2) três miRNAs (miR-26b, miR-155 e miR-132) e seus respectivos genes alvo (MYCBP, SOCS1 e FOXO3) e 3) infiltrado de macrófagos. Então, nossos objetivos foram relacionar a obesidade com um processo inflamatório, analisando: (1) o padrão das VEs pequenas séricas em cães obesos antes e após uma restrição calórica (Capítulo 2); (2) o padrão das VEs pequenas séricas em cadelas obesas, assim como a expressão do miR-26b, miR-132 e miR-155 nessas vesículas (Capítulo 3); (3) os marcadores de inflamação (leucócitos, proteína C reativa e fibrinogênio); a presença de macrófagos, os níveis de transcritos dos miR-26b, miR-132 e miR-155 e a expressão dos seus respectivos genes alvo MYCBP, FOXO3 e SOCS1 no tecido adiposo subcutâneo (Capítulo 4).

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A. *et al.* miR-26 suppresses adipocyte progenitor differentiation and fat production by targeting Fbxl19. **Genes Dev.**, v. 33, n. 19-20, p. 1367-1380, 2019.
- AGUILERA-ROJAS, M. *et al.* Exploration of serum-and cell culture-derived exosomes from dogs. **BMC Vet Res.**, v. 14, n. 1, p. 179, 2018.
- ARNER, P.; KULYTÉ, A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. **Nat Rev Endocrinol** v. 11, n. 5, p. 276, 2015.
- ASSOCIATION FOR PET OBESITY PREVENTION. **U.S. Pet Obesity Rates Plateau and Nutritional Confusion Grows.** 2018. Disponível em: <https://petobesityprevention.org/2018>.
- BURNS, K. Taking on obesity as a disease: Statement, sessions, and toolkit address the excess weight so common now in cats, dogs, and horses. 2018. Disponível em: <https://www.avma.org/javma-news/2018-10-01/taking-obesity-disease>
- CAMINO, T. *et al.* Deciphering adipose tissue extracellular vesicles protein cargo and its role in obesity. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 24, p. 9366, 2020.
- EIKELIS, N. *et al.* MicroRNA-132 may be associated with blood pressure and liver steatosis—preliminary observations in obese individuals. **J. Hum. Hypertens.**, p. 1-6, 2021.
- GE, Q. *et al.* microRNAs as a new mechanism regulating adipose tissue inflammation in obesity and as a novel therapeutic strategy in the metabolic syndrome. **J Immunol Res**, v. 2014, 2014.
- GERMAN, A. J. Style over substance: what can parenting styles tell us about ownership styles and obesity in companion animals? **Br J Nutr**, v. 113, n. S1, p. S72-S77, 2015.
- GUERREIRO, V. A.; CARVALHO, D.; FREITAS, P. Obesity, Adipose Tissue, and Inflammation Answered in Questions. **J. Obes.**, v. 2022, 2022.
- IZAOLA, O. *et al.* Inflamación y obesidad (lipoinflamación). **Nutr Hosp**, v. 31, n. 6, p. 2352-2358, 2015.
- JERICÓ, M. M. *et al.* Obesidade Canina e Felina. **Associação Brasileira de Endocrinologia Veterinária (ABEV)**, p.40,2018.
- KIM, A.; SHAH, A. S.; NAKAMURA, T. Extracellular vesicles: a potential novel regulator of obesity and its associated complications. **Children**, v. 5, n. 11, p. 152, 2018.
- KLÖTING, N. *et al.* MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. **PLoS one**, v. 4, n. 3, p. e4699, 2009.

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

LI, G. *et al.* miR-26b promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through targeting PTEN. **DNA Cell Biol.**, v. 36, n. 8, p. 672-681, 2017.

MONTOYA-ALONSO, J. A. *et al.* Prevalence of canine obesity, obesity-related metabolic dysfunction, and relationship with owner obesity in an obesogenic region of Spain. **Front Vet Sci**, v. 4, p. 59, 2017.

MULDER, N. L. *et al.* AAV8-mediated gene transfer of microRNA-132 improves beta cell function in mice fed a high-fat diet. **J. Endocrinol.**, v. 240, n. 2, p. 123-132, 2019.

PENSO-DOLFIN, L. *et al.* An improved microRNA annotation of the canine genome. **PLoS one**, v. 11, n. 4, p. e0153453, 2016.

PIANTEDOSI, D. *et al.* Serum biochemistry profile, inflammatory cytokines, adipokines and cardiovascular findings in obese dogs. **Vet J**, v. 216, p. 72-78, 2016.

PORSANI, M. Y. H. *et al.* Prevalence of canine obesity in the city of São Paulo, Brazil. **Sci. Rep.**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

RAFFAN, E. *Obesidade como Doença Endócrina: Teoria e Aplicação Clínica.* 2022.

SONG, G. *et al.* The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation. **Gene**, v. 533, n. 2, p. 481-487, 2014.

THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **J Extracell. Vesicles**, v.7, n.1, p.1535750, 2018.

VENDRAMINI, T. H. A. *et al.* Gene expression of the immunoinflammatory and immunological status of obese dogs before and after weight loss. **Plos one**, v. 15, n. 9, p. e0238638, 2020.

WARD, E.; GERMAN, A. J.; CHURCHILL, J. A. The global pet obesity initiative position statement. 2019. Disponível em: <https://static1.squarespace.com/static/597c71d3e58c621d06830e3f/t/5da311c5519bf62664dac512/1570968005938/Global+pet+obesity+initiative+position+statement.pdf>

XENOULIS, P. G.; STEINER, J. M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. **Vet J**, v. 183, n. 1, p. 12-21, 2010.

XU, J. *et al.* Secreted phospholipase A2 inhibitor modulates fatty acid composition and reduces obesity-induced inflammation in Beagle dogs. **Vet J**, v. 204, n. 2, p. 214-219, 2015.

YAM, P. S. *et al.* Impact of canine overweight and obesity on health-related quality of life. **Prev Vet Med**, v. 127, p. 64-69, 2016.

ZHAO, X. *et al.* Adipose tissue macrophage-derived exosomes induce ferroptosis via glutathione synthesis inhibition by targeting SLC7A11 in obesity-induced cardiac injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 182, p. 232-245, 2022.

ZHU, J. *et al.* Correlation analysis of microribonucleic acid-155 and microribonucleic acid-29 with type 2 diabetes mellitus, and the prediction and verification of target genes. **J. Diabetes Investig**, v. 12, n. 2, p. 165-175, 2021.

ZHUANG, G. *et al.* A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity associated adipose tissue inflammation. **Circulation**, v. 125, n. 23, p. 2892-2903, 2012.

**CHAPTER 2. SERUM SMALL EXTRACELLULAR VESICLES IN OVERWEIGHT
AND OBESE DOGS BEFORE AND AFTER WEIGHT LOSS**

**P.C. da Silva Nunes¹, S.M. Silva¹, R. Mazzarella¹, C.G. Lima¹, J.C. da Silveira¹,
D.C.A. Leite-Dellova¹.**

¹Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo,
Department of Veterinary Medicine, Pirassununga, Brazil

(Submitted on October 6, 2021 in the journal **Arquivo Brasileiro de Medicina
Veterinária e Zootecnia**, ISSN: 0102-0935 / 1678-4162, Impact factor: 0.442)

RESUMO

As vesículas extracelulares (VEs) são nanopartículas circundadas por uma bicamada lipídica, que transportam lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e metabólitos, e podem ser secretadas por diferentes tipos celulares. Os adipócitos são capazes de sintetizar e secretar VEs pequenas, que, uma vez na circulação, podem alcançar diferentes sistemas orgânicos, permitindo a comunicação intercelular. O objetivo deste estudo foi avaliar o diâmetro e a concentração de VEs pequenas no soro de cães com sobrepeso e obesidade, antes e após a perda de peso. Para isso, foram recrutados 19 cães, sendo nove fêmeas e 10 machos castrados, em bom estado geral e com escore de condição corporal (ECC) ≥ 7 . A avaliação inicial dos cães incluiu o exame físico e testes laboratoriais. Após avaliação inicial, os cães foram alimentados com uma dieta hipocalórica comercial por 4 meses, e, após este período, os testes laboratoriais foram reavaliados. As VEs pequenas foram isoladas a partir do sangue total, por meio de centrifugações e ultracentrifugações seriadas e o equipamento NanoSight foi utilizado para a determinação do diâmetro e concentração das VEs pequenas presentes no soro antes e após a dieta. Houve uma redução de 10 % do peso corporal e de 16,5 % do ECC dos cães, além da diminuição de 9 % do diâmetro e de 31 % da concentração das VEs pequenas. Não foram observadas diferenças em relação às análises bioquímicas e entre os resultados de fêmeas e machos, antes e após a perda de peso. A redução do peso corporal e do acúmulo de gordura foi acompanhada pela diminuição do diâmetro e da concentração das VEs pequenas; portanto, estes resultados sugerem uma redução da atividade secretora do tecido adiposo dos cães, após 4 meses de dieta hipocalórica.

Palavras-chave: VEs pequenas, biópsia líquida, dieta hipocalórica, pequenos animais

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are nanoparticles that transport lipids, proteins, nucleic acids, and metabolites, and can be secreted by different cell types. Adipocytes are capable of synthesizing and secreting small EVs (sEVs) into circulation, allowing intercellular communication in different organ systems. This study aimed to evaluate the diameter and concentration of sEVs in the serum of overweight and obese dogs, before and after weight loss. Nineteen dogs were recruited: nine females and 10 castrated males, in good general condition and with a body condition score (BCS) ≥ 7 . The dogs were fed a commercial low-calorie diet for 4 months and then re-evaluated. sEVs were isolated from whole blood and analyzed using NanoSight equipment. After 4 months, there was a 10% reduction in body weight and 16.5% in BCS of dogs. No differences were observed in biochemical analyzes and between the results of females and males, before and after weight loss. The reduction in body weight and fat accumulation was accompanied by a decrease in the diameter (-9%) and concentration (-31%) of sEVs; therefore, these results suggest a reduction in the adipose tissue secretory activity of dogs after 4 months of low-calorie diet.

Keywords: Small EVs, liquid biopsy, hypocaloric diet, small animals

Overweight and obesity are among the most common health problems in dogs and one of the main causes of veterinary clinic visits. Genetic predisposition and imbalance between intake and caloric expenditure are among the main causes of canine obesity. In this sense, neutering also contributes to body weight gain, as well as the dog-tutor interaction, due to encouragement and motivation for food intake as a form of reward. (Porsani et al., 2020).

Adipose tissue is a dynamic metabolic and endocrine organ that performs its functions through cell-to-cell communication by producing and releasing growth factors, hormones, and cytokines (Izaola et al., 2015). It has been recently found that adipose tissue can synthesize, release, and transfer small extracellular vesicles (sEVs) to target cells influencing its regulation (Pardo et al., 2018).

EVs are nanoparticles secreted by different cell types, including adipocytes, which can carry molecular and genetic information. Initially, these nanoparticles were classified according to their biogenesis, secretion, and size as exosomes (30 to 150 nm), microvesicles (100 to 1000 nm), and apoptotic bodies (1 to 5 μ m). However, due to the difficulty in establishing the exact origin of EVs, they can be classified according to their size as small EVs (sEVs; < 200nm) and large EVs (IEVs; > 200nm) as recommended by the International Society of Extracellular Vesicles - ISEV (Théry et al., 2018).

Among the distinct extracellular vesicles, sEVs can perform intercellular communication, genetic exchange, and antigen presentation. Additionally, the transport of their contents, such as proteins, lipids, and RNAs (including mRNAs and non-coding RNAs), allows sEVs to significantly affect at cellular and biological level their targets. Due to the presence of sEVs in different body fluids, the analysis and characterization of their contents define them as potential minimally invasive biomarkers and, as they are easily isolated from body fluids, they can be used as “liquid biopsy” (Aguilera-Rojas et al., 2018).

Once in circulation, sEVs can reach various organ systems, enabling intercellular communication and thus, the systemic metabolic regulation, including inflammatory process, the function of pancreatic beta cells, tissue sensitivity to insulin, and lipid metabolism. Furthermore, sEVs seem to play a critical role in the obesity pathogenesis and its metabolic complications in humans and animal models (Kim et al., 2018). Other studies have been carried out to determine the circulating concentration of sEVs in dogs with neoplasia, such as lymphoma and mammary

adenocarcinoma (Garnica et al., 2020). However, there are no studies relating sEVs to canine obesity.

In this way, this study aimed to evaluate the serum sEVs diameter and concentration in overweight and obese dogs before and after the weight loss program. The experimental protocol of this study was approved by the institution's Ethics Committee on Animal Use (protocol number CEUA 1940130519).

Inclusion criteria were: dogs aged between two and 13 years, neutered, body condition score (BCS) greater than or equal to seven (Laflamme, 1997), good general condition, without signs of concomitant diseases such as diabetes mellitus, liver disease, kidney disease and neoplasms.

The experimental group consisted of 19 neutered dogs, nine females and 10 males, including mixed breed (n=3), Poodle (n=3), Maltese (n=2), Shih-tzu (n=2), Pug (n=2), and one of each of the following breeds: American cattle dog, Dalmatian, Golden retriever, Labrador retriever, Lhasa apso, Shetland shepherd, and Yorkshire.

Initially, dogs underwent clinical evaluation, including laboratory tests. Blood was collected from the jugular vein after a 12-h fasting period for hematological, biochemical, and sEVs examination. Blood count was performed using automatic blood analyzer, model BC-2800 Vet (Mindray BioMedical Electronics Co. Ltd., China). Serum glucose, cholesterol, triglycerides and albumin concentration and serum alkaline phosphatase (ALP) enzyme activity were assessed with specific kits (Labtest Diagnostica S.A., Brazil) using biochemical analyzer, model BS-120 (Mindray BioMedical Electronics Co. Ltd., China).

For sEVs analysis, blood samples were initially centrifuged (2,400 rpm, 30 min) to obtain serum. Subsequently, serum samples underwent three consecutive centrifugations at 4 °C: 300 xg for 10 min to remove live cells, 2,000 xg for 10 min to remove cell debris, and 16,500 xg for 30 min to remove large vesicles, and then the supernatant was stored at -80° C until further use. For sEVs isolation, samples were thawed on the day of analysis, and supernatants were filtered using syringe filter with 0.20 µm pore polyethersulfone (PSE) membrane (Corning, USA), then centrifuged at 119,700 xg for 70 min at 4 °C twice. The resulting pellet was resuspended in 50 µL of phosphate-buffered saline (1X Ca²⁺/Mg²⁺ free PBS).

Particle diameter and concentration were measured by nanoparticle tracking analysis (NTA) using NanoSight equipment, model NS300 (Malvern Panalytical, United Kingdom). Briefly, five 30-s videos were taken for each diluted sample (1:100

in PBS) and captured by a scientific complementary metal–oxide–semiconductor (sCMOS) camera at camera level 13, under controlled temperature of 38.5 °C. Considering the threshold level of five, these captured images were tracked by the NanoSight NTA 3.4 Analytical Software, model NTA 3.4 Build 3.4.003 (Malvern Panalytical, United Kingdom), as described by de Ávila et al. (2020).

Additionally, the presence of serum sEVs was confirmed by the expression of specific proteins by western blotting, according to a previously established protocol (de Ávila et al., 2020). For this, the primary antibodies used were goat polyclonal anti-Alix (1:1000; sc-49267; Santa Cruz, USA) and goat polyclonal anti-Cytochrome C (1:1000; sc-8385; Santa Cruz, USA). The secondary antibody used was anti-goat IgG (1:4000; sc-2020; Santa Cruz, USA).

After initial clinical evaluation and sEVs analysis, dogs started the weight loss program, being fed with commercial low-calorie diet (Pro Plan OM Overweight Management, Purina, Brazil) for four months. The resting energy requirement (RER) was calculated using the following equation: $RER = [70 \times (\text{ideal body weight in Kg})^{0.75}]$ (Brooks et al., 2014), with ideal body weight being equivalent to the dog's current weight minus 10 %. The daily feed amount was calculated by dividing the RER value by the metabolizable energy of the commercial low-calorie diet (2,990 kcal/kg) and meals were divided into two or three daily servings. Dogs were evaluated every 15 days for weighing and general physical examination.

Blood count, serum albumin concentration and ALP activity were determined only in the recruitment and general evaluation phase of dogs. Serum glucose, cholesterol, triglyceride concentration, and sEVs analysis were performed before the beginning and at the end of the weight loss program.

Regarding the statistical analysis, the effect of sex, time, and sex / time interaction on body weight, BCS, serum glucose, cholesterol, triglycerides concentration, and serum sEVs diameter and concentration were evaluated by ANOVA, using the SAS software, version 9.3 (SAS Institute Inc., USA). Effects with $p \leq 0.10$ were considered statistically significant. ANOVA assumptions were evaluated by SAS/LAB. Results were presented as mean values with their respective standard errors of the mean (SEM).

Blood count, serum albumin concentration, and serum ALP activity were normal for all dogs. No differences were observed between female and male dogs before and after the weight loss program. Therefore, sex and sex / time interaction had no effect

on body weight, BCS, serum glucose, cholesterol, triglycerides concentration, and serum sEVs diameter and concentration (Tab. 1). In contrast, time had significant effect on body weight, BCS, serum sEVs diameter and concentration (Tab. 1). This result indicates a change in these parameters, comparing values obtained before and after the four-month weight loss program. In this sense, reduction on the mean body weight, BCS, serum sEVs diameter and concentration values after the weight loss program was observed (Tab. 2 and Fig. 1). Mean serum glucose, cholesterol, and triglycerides concentration values did not differ before and after weight loss (Tab. 2).

Table 1. ANOVA – Effect of sex, time, and sex / time interaction on different parameters of dogs. Results correspond to the p-value.

Parameters	Sex	Time	Sex / time interaction
Body weight (Kg)	0.8305	0.0062*	0.2198
Body condition score	0.4555	<0.0001*	0.2583
Glucose (md/dL)	0.2100	0.1290	0.2045
Cholesterol (mg/dL)	0.7926	0.3170	0.6077
Triglycerides (mg/dL)	0.1064	0.9322	0.1860
Serum sEVs diameter	0.8303	0.0574*	0.3526
Serum sEVs concentration	0.8373	0.0450*	0.7886

sEVs: small extracellular vesicles; * p < 0.10.

Table 2. Means body weight, body condition score, and serum biochemical parameter values in female and male dogs, before and after the weight loss program.

Parameters	Before	After	p-value
Body weight (Kg)	15.50 ± 2.48 A	13.95 ± 2.17 B	0.0062
Body condition score	8.21 ± 0.20 A	6.83 ± 0.20 B	<0.0001
Glucose (md/dL)	96.06 ± 3.00 A	90.15 ± 3.00 A	0.1290
Cholesterol (mg/dL)	203.46 ± 10.85 A	192.11 ± 10.85 A	0.3170
Triglycerides (mg/dL)	91.73 ± 12.82 A	92.55 ± 12.16 A	0.9322

± SEM. Different letters on the same line represents difference between mean values.

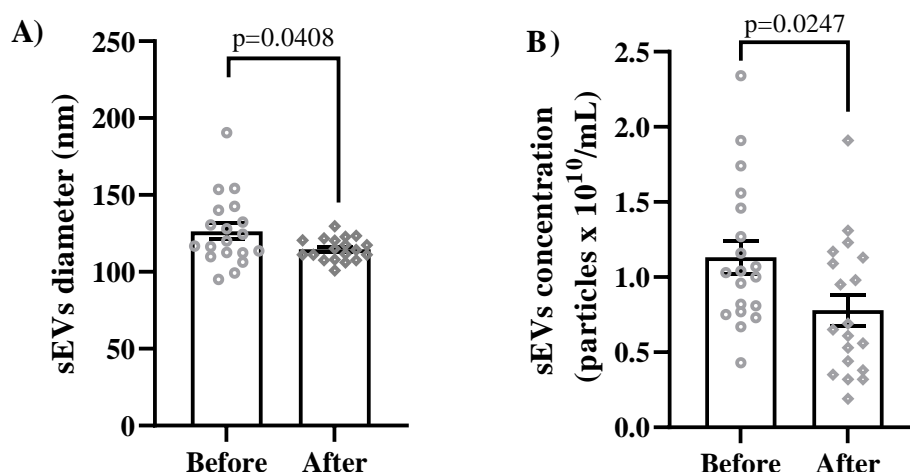


Figure 1. Small extracellular vesicles (sEVs) diameter and concentration in dog serum before and after the weight loss program. After weight loss, there was a reduction in the mean (\pm SEM) diameter (126.30 ± 5.219 versus 114.60 ± 1.668 nm) **(A)** and concentration (1.13 ± 0.110 versus 0.78 ± 0.103 particles $\times 10^{10}$ /mL) **(B)** values of serum sEVs.

Western blot demonstrated that sEVs isolated from dog serum expressed the endosome marker (Alix) but did not express the mitochondrial membrane marker (Cytochrome C) (Fig. 2). This result indicates that isolated sEVs are not cells and that there was no contamination of samples by cells; therefore, the isolation protocol was correctly performed. Cells express both markers as they contain endosomes and organelles, including mitochondria.

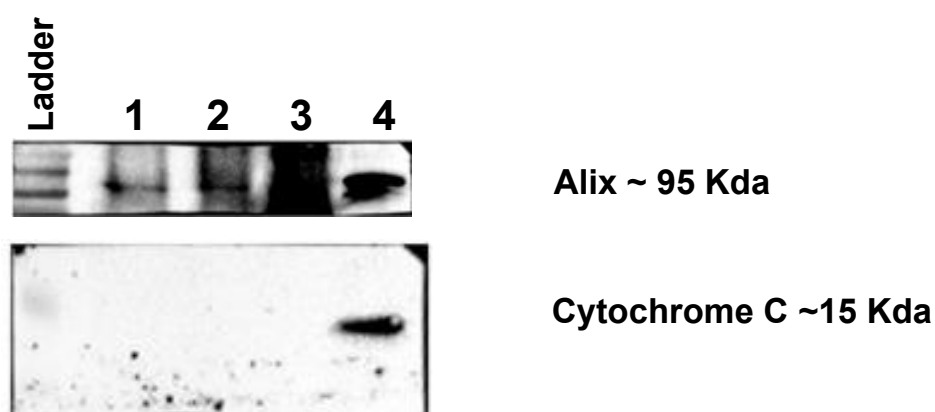


Figure 2. Analysis of protein Alix and Cytochrome C in serum small extracellular vesicles (sEVs) and cells. Lines 1-4: protein lysate from serum sEVs of obese female, obese male, and lean male dogs, and from bovine oviductal cells, respectively. Alix is an endosome pathway marker and was detected in both sEVs and animal cells. Cytochrome C is a mitochondrial membrane marker and was only detected in cells.

After four months, 10 % reduction in the body weight of dogs was observed (Tab. 2). Therefore, the initial goal of the weight loss program was reached (i.e., initial

body weight minus 10 %). In addition, 16.5 % reduction in BCS was also observed (Tab. 2), indicating reduction in body fat accumulation. The reduction in body weight and BCS of dogs resulted in a reduction of 9 % in the diameter and of 31 % in the concentration of serum sEVs (Fig. 1). Similar results have been described in obese humans. Eguchi *et al.* (2006) demonstrated that in obese humans, the number of circulating EVs (/ μ L of plasma) was reduced by 35% after 3 months of treatment with low-calorie diet. Furthermore, the greater amount of circulating EVs in obese humans has been linked to comorbidities caused by obesity, such as low-grade inflammatory state (Eguchi *et al.*, 2006; Campello *et al.*, 2016). Thus, we hypothesize that in obese individuals, the adipose tissue increases its capacity to produce and release sEVs into the circulation. Furthermore, reduction in sEVs diameter and concentration in overweight or obese dogs, after body weight loss, indicates reduction in endocrine and paracrine communication in the adipose tissues of this specie.

The results of this study indicate that the analysis of serum sEVs can be used in the assessment of overweight and obese dogs, before and after treatment. This is the first study evaluating body fat accumulation and circulating sEVs in dogs. Therefore, the “liquid biopsy”, together with the assessment of the sEVs content could be one of the criteria for the diagnosis and monitoring of canine obesity and its comorbidities.

REFERENCES

- AGUILERA-ROJAS, M.; BADEWIEN-RENTZSCH, B.; PLENDL, J. et al. Exploration of serum-and cell culture-derived exosomes from dogs. **BMC Vet. Res.**, v.14, n.1, p.1-9, 2018.
- BROOKS, D.; CHURCHILL, J.; FEIN, K. et al. 2014 AHA weight management guidelines for dogs and cats. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.50, n.1, p. 1-11, 2014.
- CAMPELLO, E.; ZABEO, E.; RADU, C.M. et al. Dynamics of circulating microparticles in obesity after weight loss. **Intern. Emerg. Med.**, v.11, n.5, p.695-702, 2016.
- DE ÁVILA, A.C.F.C.M.; BRIDI, A.; ANDRADE, G. M. et al. Estrous cycle impacts microRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during in vitro maturation. **Biol. Reprod.**, v.102, n.2, p. 362-375, 2020.
- EGUCHI, A.; LAZIC, M.; ARMANDO, A.M. et al. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. **J. Mol. Med.**, v.94, n.11, p.1241-1253, 2016.
- GARNICA, T.K.; LESBON, J.C.C; ÁVILA, A.C.F.C.M. et al. Liquid biopsy based on small extracellular vesicles predicts chemotherapy response of canine multicentric lymphomas. **Sci. Rep.**, v.10, n.1, p.1-11, 2020.
- IZAOLA, O.; LUIS, D.; SAJOUX, I. et al. Inflamación y obesidad (lipoinflamación). **Nutr. Hosp.**, v.31, n.6, p.2352-2358, 2015.
- KIM, A.; SHAH, A.S.; NAKAMURA, T. Extracellular Vesicles: A Potential Novel Regulator of Obesity and Its Associated Complications. **Children**, v.5, n.11, p.152, 2018.
- LAFLAMME, D. Development and validation of a body condition score system for dogs: A clinical tool. **Canine Pract.**, n.22, p.10–15, 1997.
- PARDO, F.; VILLALOBOS-LABRA, R.; SOBREVIA, B. et al. Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. **Mol. Aspects Med.**, v.60, p.81-91, 2018.
- PORSANI, M.Y.H.; TEIXEIRA, F.A.; OLIVEIRA, V.V. et al. Prevalence of canine obesity in the city of São Paulo, Brazil. **Sci. Rep.**, v.10, n.1, p.1-15, 2020.
- THÉRY, C.; WITWER, K.W; AIKAWA, E. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **J Extracell. Vesicles**, v.7, n.1, p.1535750, 2018.

**CHAPTER 3. EVALUATION OF CIRCULATING EXTRACELLULAR VESICLES
AND THEIR miRNA CONTENTS IN NEUTERED AND OBESE FEMALE DOGS**

Paola Caroline da Silva Nunes¹, Rosane Mazzarella¹, Juliano Coelho da
Silveira¹, and Deise Carla Almeida Leite Dellova¹

¹Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo,
Department of Veterinary Medicine, 13635-900, Pirassununga, Brazil

(Submitted May 12, 2022, in the journal **Scientific Report**, ISSN: 2045-2322,
Impact factor: 4.380)

ABSTRACT

Adipose tissue is a metabolic and endocrine organ, and its adipocytes can synthesize and secrete extracellular vesicles (EVs), thus allowing intercellular communication. EVs are nanoparticles that transport lipids, proteins, metabolites, and nucleic acids (mRNA and microRNAs). MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that regulate gene expression. miR-132, miR-26b, and miR-155 are associated with obesity, lipid metabolism and adipogenesis. The aim of this study was to evaluate the size, concentration, and content of miRNAs (miR-132, miR-26b, and miR-155) in serum EVs from obese female dogs. Thirty-two neutered females in good general condition were recruited, including 21 obese and 11 healthy controls. The initial evaluation of the females included a general physical examination and laboratory tests. Small EVs (sEVs) were isolated from whole blood by serial centrifugation and ultracentrifugation, and NanoSight was used to determine the size and concentration of serum sEVs. miRNAs were extracted from sEVs and analyzed by real-time polymerase chain reaction. Obese female dogs with hypertriglyceridemia showed an increase in the serum concentration of sEVs and in the expression of miR-132 and miR-26b contained therein. No changes were observed in the group of obese female dogs with normal serum biochemical profile and in relation to miR-155 expression. These results suggest that with the expansion of adipose tissue related to obesity can alter cell communication, through changes in sEVs, primarily in female dogs with hyperlipidemia.

Keywords: small animals, obesity, hypertriglyceridemia, miR-26b, miR-132

1. INTRODUCTION

Adipose tissue is a metabolic and endocrine organ that actively participates in energy regulation, carbohydrate and lipid metabolism, inflammation, and coagulation cascades. This tissue has the function of storing and releasing energy, participates in the immune response, and performs cell-to-cell communication through the release of hormones, cytokines, and growth factors (1, 2). Furthermore, adipose tissue can synthesize, release, and transfer extracellular vesicles (EVs) to cells that could be regulated by it (target cells) (3).

EVs are nanoparticles synthesized by different cells, including adipocytes, and secreted into the extracellular environment, thus communicating with different organs. They can be classified according to their biogenesis as follows: apoptotic bodies (1–5 μm), microvesicles (100–1000 nm), and exosomes (30–150 nm) (4). Due to the difficulty in establishing their exact origin, the International Society of Extracellular Vesicles also classifies EVs according to size: small EVs (sEVs) (< 200 nm) and large EVs (> 200 nm) (5).

Intercellular communication, genetic exchange, and antigen presentation occur through the content of EVs, including proteins, lipids, and nucleic acids, such as mRNA and microRNAs (miRNAs) (6). The presence of EVs in different body fluids and their ease of isolation allows the analysis and characterization of their content, being defined as less invasive biomarkers, and their extraction as “liquid biopsy” (7).

miRNAs are a highly conserved group of small non-coding RNAs approximately 22 nucleotides in length that regulate gene expression. miRNAs can repress translation and/or initiate target mRNA degradation through base pairing at complementary sites within mRNA, thus controlling diverse biological processes in different tissues (8, 9).

Obesity is defined as excess body fat resulting from a positive energy balance when there is high consumption but low energy expenditure, which may also result in one or more comorbidities. Currently, obesity is treated as a complex clinical syndrome with a multifactorial etiology, with emphasis on positive energy balance, genetic, metabolic, and endocrine factors, as well as the use of drugs that induce excessive food intake, such as the corticosteroids (10). A study conducted in a big Brazilian city

showed a prevalence of 40.5% in overweight and obese dogs, with a higher prevalence in spayed female dogs (11).

Studies carried out in humans and mice have shown that obesity can alter the size, number, and content of EVs, including miRNAs expression (12). In this sense miR-132, miR-26b, and miR-155 are associated with obesity, lipid metabolism, adipogenesis, macrophage infiltration, inflammation, and insulin secretion, among others (13, 14, 15).

There is no evidence from studies in female dogs relating obesity to the analysis of serum EVs and the profile of miRNAs contained in them. Therefore, the objective of this study was to isolate sEVs from the serum samples of female dogs with a normal body condition score (BCS) and obesity, using centrifugation techniques, to later characterize these nanoparticles (size and concentration of the sEVs) and evaluate the expression of miR-132, miR-26b, and miR-155 in their contents, using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR).

2. RESULTS

2.1. Obese female dogs have increased serum triglyceride concentration

All recruited females had normal parameters in the clinical evaluation, and obese female dogs presented free T4 concentrations within the normal range for the species. There was no statistical difference in the age range between the groups, however the obese group had a higher median for the body condition score (BCS) 9 (8; 9) X 5 (5; 5) and for the body weight 12.4 kg (5.1 kg; 46.8 kg) X 7.5 kg (4.6 kg; 28.6 kg). The characteristics of the groups (age, weight, BCS and breed) are shown in Table 1.

Characteristics	Control Group (n=11) number of animals (%)	Obese Group (n=21) number of animals (%)
Age (years)		
3 - 5	7 (63.6%)	12 (57.1%)
6 - 8	4 (36.4%)	9 (42.8%)
Weight (kg)		
0 - 6	4 (36.4%)	3 (14.3%)
7 - 10	6 (54.5%)	7 (33.3%)
11 - 20	0	5 (23.8%)
21 - 30	1 (9.1%)	1 (4.8%)
> 30	0	5 (23.8%)
BCS		
5	11 (100%)	0
8	0	9 (42.7%)
9	0	12 (57.3%)
Breed		
Maltese	1 (9.1%)	2 (9.52%)
Dachshund	2 (18.2%)	1 (4.76%)
Mixed breed	4 (36.4%)	6 (28.6%)
Shih-Tzu	2 (18.2%)	4 (19.1%)
Rottweiler	0	1 (4.76%)
English Pointer	0	1 (4.76%)
Golden retriever	0	3 (14.3%)
Beagle	0	1 (4.76%)
English Pointer	0	1 (4.76%)
Cocker spaniel	0	1 (4.76%)
Lhasa Apso	1 (9.1%)	0
Pinscher	1 (9.1%)	0

Table 1. Characteristics of groups. n: number of dogs per group

In the urinalysis examination, there was no difference between the groups in relation to the parameters evaluated, and the females did not present glycosuria and signs of inflammation and/or infection. The groups did not differ in terms of the blood count parameters (Table 2). In relation to the biochemical profile, obese group had a higher serum concentration of triglycerides than the control group (Table 3).

Parameters	Control (n=11)	Obese (n=21)	p-value
Erythrocytes ($10^6/\mu\text{L}$)	7.8 \pm 0.10	7.4 \pm 0.16	0.0581
Hemoglobin (g/dL)	19.2 \pm 0.32	18.2 \pm 0.38	0.1206
Hematocrit (%)	53.7 \pm 0.94	51.5 \pm 1.0	0.1767
Plasma protein (g/dL)	7.2 \pm 0.29	7.3 \pm 0.11	0.6972
Platelets ($/\mu\text{L} \times 10^4$)	26.9 \pm 3.7	32.3 \pm 2.9	0.2698
Leucocytes ($/\mu\text{L} \times 10^3$)	9.5 \pm 0.81	9.7 \pm 0.57	0.8395
Neutrophil ($/\mu\text{L} \times 10^3$)	5.9 \pm 0.59	6.3 \pm 0.39	0.3886
Eosinophils ($/\mu\text{L} \times 10^2$)	7.5 \pm 1.3	7.9 \pm 1.7	0.4241
Lymphocytes ($/\mu\text{L} \times 10^3$)	2.4 \pm 0.49	2.2 \pm 0.19	0.6082
Monocytes ($/\mu\text{L} \times 10^2$)	4.6 \pm 0.83	4.3 \pm 0.56	0.7298

Table 2. Average values of hematological findings. \pm : standard error. The comparison between the mean values was performed using the unpaired t-test. $p < 0.05$.

Parameters	Control (n=11)	Obese (n=21)	p-value
Cholesterol (mg/dL)	210.6 \pm 20.7	228.3 \pm 14.2	0.4788
Triglyceride (mg/dL)	87.4 \pm 23.2	148.5 \pm 22.7	0.0246
Glucose (mg/dL)	104.8 \pm 3.5	111.8 \pm 2.8	0.1382
ALP (UI/L)	46.4 \pm 5.9	61.9 \pm 9.4	0.3554
AF (UI/L)	86.8 \pm 32.2	91.1 \pm 33.3	0.6043
GGT (UI/L)	4.5 \pm 0.62	3.8 \pm 0.63	0.1019
Total Protein (g/dL)	6.7 \pm 0.28	6.6 \pm 0.09	0.6873
Albumin (g/dL)	3.5 \pm 0.07	3.5 \pm 0.06	0.8283
Urea (mg/dL)	32.4 \pm 2.4	35.9 \pm 2.3	0.3361
Creatinine (mg/dL)	1.0 \pm 0.06	1.0 \pm 0.03	0.6654

Table 3. Mean values of the biochemical profile. ALP: serum alkaline phosphatase activity; AF: alkaline phosphatase; GGT: gamma glutamyl transferase; \pm : standard error. The comparison between the mean values was performed using the unpaired t-test. $p < 0.05$.

Principal component analysis (PCA) showed that some obese female dogs were grouped together because they had higher serum triglyceride and serum sEVs concentrations (Figure 1). Based on this analysis, these female dogs were regrouped into a third group called obese with alterations, and from that we compared the three groups: control (n=11), obese (n=11), and obese with alterations (n=10).

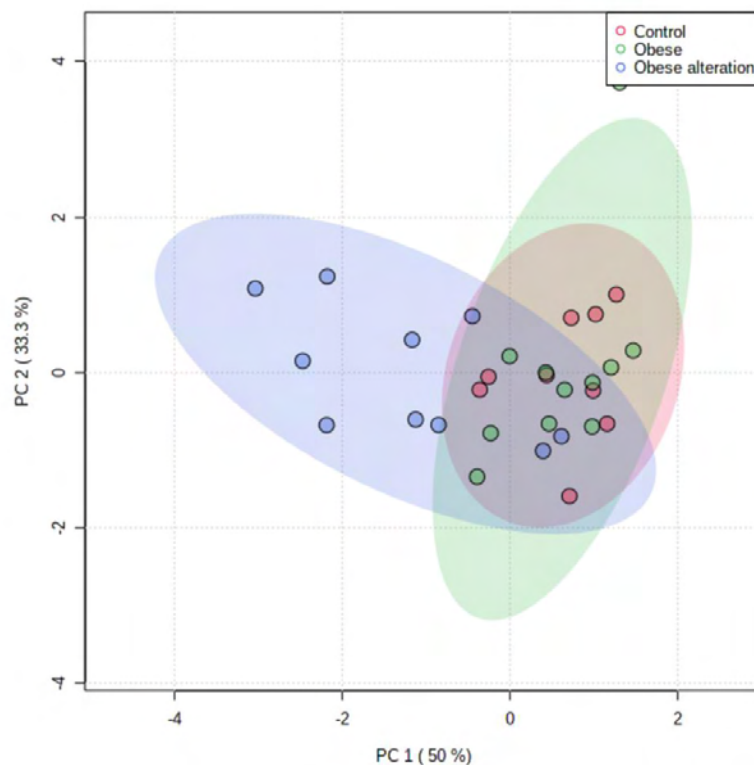


Figure 1. Principal component analysis (PCA) graph. The females of the obese group with alteration are grouped with higher levels of concentration of small EVs and serum concentration of triglycerides.

The comparison between the three groups showed that the obese group with alterations had a higher serum concentration of triglycerides than control and obese groups (Table 4), and 70% of the female dogs had a BCS of 9.

Parameters	Control (n=9)	Obese (n=11)	Obese with alteration (n=10)
Cholesterol (mg/dL)	186.6 ± 14.5 A	199.2 ± 12.7 A	260.6 ± 22.9 A
Triglyceride (mg/dL)	65.1 ± 11.8 B	83.6 ± 10.5 B	219.8 ± 34.4 A

Table 4. Mean values of serum concentration of cholesterol and triglycerides. ±: standard error. The comparison between the mean values was performed using the Tukey test. Different letters on the same line indicate statistical difference ($p < 0.05$).

2.2. Protocol efficiency for sEVs analysis

The efficiency of the sEVs isolation protocol was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) and Western blotting. Figure 2 shows the TEM results,

identifying particles with characteristic shapes and sizes similar to sEVs, and the Western blotting result with the sEVs expressing the surface marker protein CD9 and the inner protein Alix and not expressing the cellular marker protein cytochrome C.

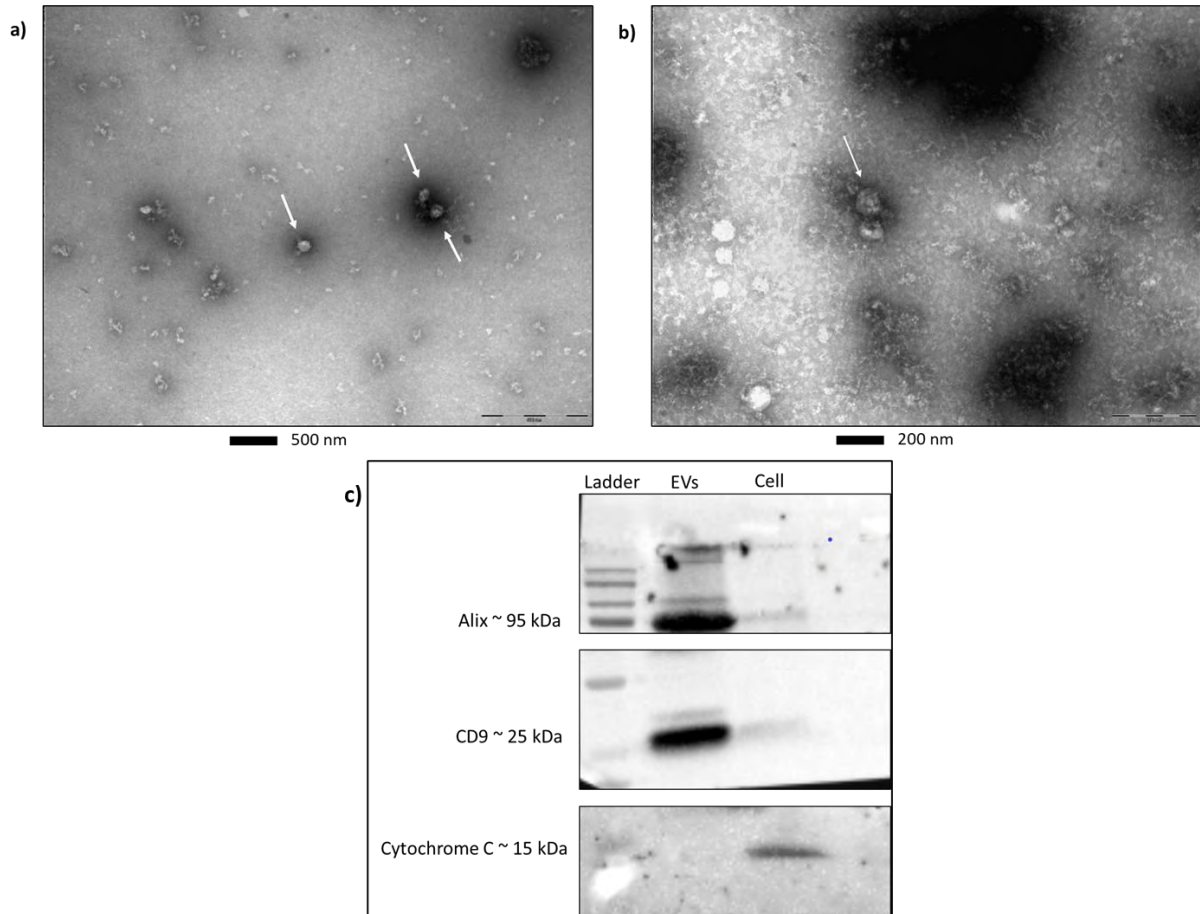


Figure 2. Transmission electron microscopy and Western blotting analysis. **(a)** Arrows indicate small EVs observed in electron microscopy at 500 nm size. **(b)** Arrow indicates extracellular vesicle at 200 nm size. **(c)** The isolated serum pellet from a female dog expresses the Alix and CD9 proteins, but it does not express cytochrome C protein. The cell sample (dog skin) expresses only cytochrome C protein. Ladder: protein molecular weight.

2.3. Obese female dogs have a higher concentration of circulating sEVs and higher expression of miR-132 and miR-26b

The groups did not differ in relation to the size of sEVs; however, the obese with alteration group had a higher concentration of sEVs than the other groups. The results are shown in Figure 3.

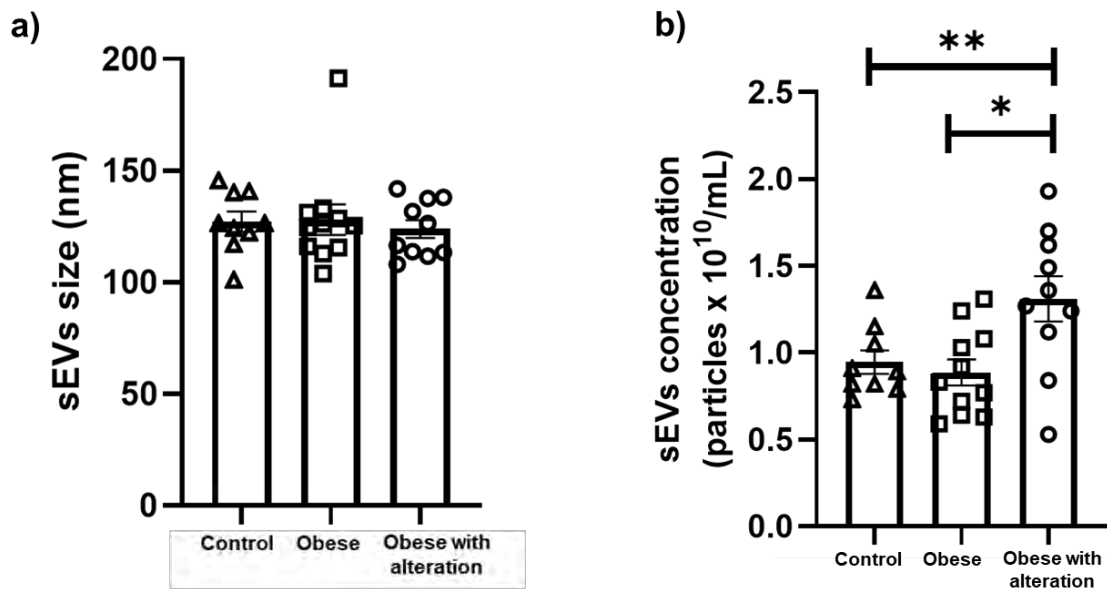


Figure 3. Analysis of sEVs. The graphs illustrate individual and mean values (\pm standard error) of **(a)** sEVs size and **(b)** sEVs concentration. The comparison between the mean values was performed using the Tukey test (* $p < 0.05$ by comparison Obese X Obese with alteration and ** $p < 0.05$ by comparison Control X Obese with alteration).

The obese with alterations group showed higher expression of miR-132 than the other groups and higher expression of miR-26b than the obese group. However, no difference in miR-155 expression was observed between groups (Fig. 4).

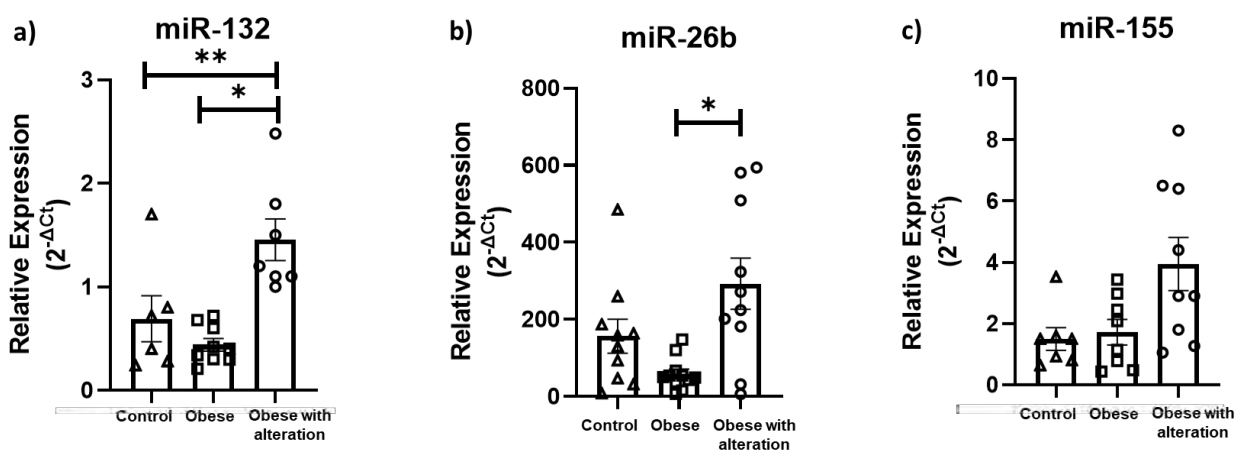


Figure 4. Relative expression of miRNAs. The graphs illustrate individual and mean values (\pm standard error) of **(a)** miR-132, **(b)** miR-26b and **(c)** miR-155. The comparison between the mean values was performed using the Tukey test (* $p < 0.05$ by comparison Obese X Obese with alteration and ** $p < 0.05$ by comparison Control X Obese with alteration).

3. DISCUSSION

Our study showed that obese female dogs with alterations had an increase in the serum concentration of triglycerides, which can be explained by excessive feeding that is not related to endocrinopathies, since these females had normal free T4 levels and no apparent signs of hyperadrenocorticism in the clinical evaluation. Considering that the expansion of adipose tissue can result in an increase in the sEVs release and in the cell communication mediated by adipocytes, hypertriglyceridemia may be related to the higher concentration of circulating sEVs and increased expression of miR-132 and miR-26b involved in the modulation of adipogenesis and lipid metabolism (13, 16). EVs and their contents reach their target cells and influence the metabolism of various tissues. These obese females (from obese with alterations group) did not show evidence of changes in other metabolic processes, only in lipid metabolism; however, it may be a matter of time, as we know the effects of chronic obesity.

After the triglyceride is delivered to the tissue, the remaining chylomicron particles are removed from circulation by the liver. VLDL, produced by hepatocytes, also contains triglycerides, which are hydrolyzed by lipoprotein lipase within the VLDL, with the remaining particles removed by hepatic circulation or suffering additional depletion of triglycerides by lipoprotein lipase or by the hepatic triglyceride lipase enzyme, thus forming LDL, which mainly transports cholesterol. Unlike humans, dogs fed a high-fat diet do not usually show an increase in cholesterol, and consequently,

LDL. When plasma triglyceride levels increase, it is assumed that one or more of these lipoproteins are also elevated (17, 18).

Hyperlipidemia, the increase in serum concentrations of triglycerides, cholesterol, or both, is frequently caused by high-fat diets, which when persistent in dogs can lead to the development of diseases such as obesity, diabetes mellitus, acute pancreatitis, hyperadrenocorticism, and hypothyroidism (17).

One study correlated the concentration of triglycerides and lipoprotein cholesterol with the with the accumulation of body fat and observed that obese and overweight dogs (BCS > 8) had higher concentrations of triglycerides, VLDL, HDL, and cholesterol than ideal scoring dogs (BCS 4 or 5) (19). Several other studies have shown that obese dogs commonly present changes in the lipidogram, mainly characterized by an increase in the concentration of triglycerides (20, 21, 22, 23). Furthermore, Diez *et al.* and Jeusette *et al.* demonstrated that obese dogs subjected to weight loss showed a significant reduction in the serum concentrations of triglycerides and cholesterol.

Obese female dogs with hypertriglyceridemia (from obese with alterations group) showed an increase in the concentration of circulating sEVs. EVs are produced in different cells and secreted into the extracellular environment, making it possible for them to communicate with different organs. They contain elements of their cell of origin such as lipids, proteins, and nucleic acids (mRNAs, total RNAs, and miRNAs). Thus, they act as vectors of biological information because they carry out intercellular communication and can modify the function of receptor organs (6). A study in obese women evaluated the association between circulating EVs concentration and obesity, biochemical parameters, and lipid metabolism and found that adiposity and lipid metabolism were associated with EVs concentration and that this had a significantly strong and positive correlation with serum triglyceride levels. In addition, through the detection of specific proteins, they observed that the adipose tissue released EVs as the tissue expanded (26).

Analysis of the content of these serum sEVs showed that obese with alterations group had higher expression of miR-132 and miR-26b. miRNAs, present in tissues and in circulation, are a class of non-coding RNAs that regulate gene expression by repressing translation and/or initiating the degradation of target mRNA, thus controlling several biological processes (8,9). Lipid metabolism is complex and can be influenced

by miRNAs, mainly regarding the modulation of the expression of genes involved in cholesterol transport and fatty acid synthesis (27).

miR-132 and miR-26b have been identified as miRNAs that are active in the regulation and development of adipocytes. Obesity has a great influence on adipogenesis, with pre-existing adipocytes expanding to accommodate excess nutrients in the form of triglycerides (28, 29). A study in obese humans found that miR-132 expression in visceral adipose tissue was associated with body mass index and that miR-132 expression in subcutaneous adipose tissue was associated with plasma triglyceride levels; thus, this miRNA plays a role in the metabolic implications caused by obesity (13). Transgenic mice overexpressing miR-132 showed a hepatic steatosis phenotype, increased body weight, and increased LDL, VLD, and hepatic triglycerides. Hanin *et al.* used antisense oligonucleotides to suppress miR-132 expression in these mice, resulting in reduced triglyceride levels and hyperlipidemia.

Studies performed in humans, mice, and cell culture have shown that miR-26b affects adipogenesis, resulting in adipocyte differentiation and triglyceride accumulation (31, 29, 32). Song *et al.* demonstrated that miR-26b in humans is associated with adipokines and is upregulated during the differentiation of preadipocytes into adipocytes. A human study evaluated the role of miR-26b in obesity, comparing preadipocytes overexpressing miR-26b with negative control cells, and observed that overexpression of miR-26b promoted adipogenesis and triglyceride accumulation in adipocytes (33).

In conclusion, obese female dogs with hypertriglyceridemia showed an increase in the serum concentration of sEVs and in the expression of miR-132 and miR-26b contained therein. No changes were observed in the group of obese female dogs with normal serum biochemical profile and in relation to miR-155 expression. These results suggest that obesity can alter cell communication, through changes in sEVs, primarily in female dogs with hyperlipidemia. Our study also suggests that miR-132 and miR-26b may become a possible therapeutic target for the control of obesity and its consequences in dogs, however, a more in-depth look at the functions and pathways of these miRNAs is certainly needed.

4. METHODS

4.1. Animal model

Thirty-two healthy neutered female dogs of different breeds, aged three and eight years old, were included in the experiment. Females were divided into two groups: obese (n = 21) and control (n = 11). After PCA, the obese female dogs were regrouped into an obese group and an obese group with alterations. The study was conducted at the Hospital Clinical Didactic Unit at the Faculty of Animal Science and Food Engineering at the University of São Paulo. The experimental protocol for this study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals at FZEA-USP (protocol number: 1940130519).

4.2. Experimental groups, sample collection and complementary examinations

Only obese female dogs with BCS of 8 and 9 were part of the experiment, presenting obesity for at least 1 year due to excessive food intake (positive energy balance). The BCS was evaluated according to the method proposed by Laflamme.

The females were subjected to blood collection (jugular venipuncture after 12 h of fasting) for screening laboratory tests and to analyze the size and concentration of sEVs. Blood counts were performed using an automatic blood analyzer and serum biochemical parameters were assessed using specific reagents and a biochemical analyzer. T4-free hormone dialysis test was performed at the PROVET (reference laboratory in the city of São Paulo/Brazil) with the radioimmunoassay methodology. Urine was collected by cystocentesis, and urinalysis comprised a dipstick analysis and sediment examination.

4.3. Isolation of sEVs

Blood samples were centrifuged (2,400 rpm for 30 min) to obtain the serum. Briefly, serum was centrifuged three times at 4°C: 300 × g for 10 min, 2,000 × g for 10 min, and 16,500 × g for 30 min to remove cells, cell debris, and large vesicles, respectively. The supernatant was stored at -80°C for further ultracentrifugation. Samples were thawed and supernatants were filtered using a 0.20 µm pore polyethersulfone (PSE) membrane syringe filter to remove any large EVs. For isolation of sEVs, the sample was subjected to two consecutive ultracentrifugation at 119,700 × g for 70 min at 4°C, according to a previously described protocol (35).

The resulting pellet was resuspended in 50 μL of phosphate buffered saline (PBS) (1X $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free PBS). Nanoparticle tracking analysis to characterize sEVs according to particle size and concentration was performed using a NanoSight NS300 instrument (Malvern Panalytical, UK). For reading, three consecutive 30-second videos were taken for each diluted sample (1:100 in PBS) and captured by the sCMOS camera at camera level 13 at a controlled temperature of 38.5°C. Considering threshold level 5, the images were tracked using the analytical software NanoSight NTA 3.4, as described by de Ávila *et al.*

4.4. Characterization of sEVs

The presence of sEVs was confirmed by the expression of specific proteins by Western blotting, according to a previously established protocol (36) and by TEM. The primary antibodies used for Western blotting were Alix anti-mouse (1:750; sab-4200476; Santa Cruz, USA), CD9 anti-mouse (1:500; sc-13118; Santa Cruz, USA), and cytochrome C anti-goat (1:1000; sc-8385; Santa Cruz, USA). The secondary antibody was anti-goat IgG (1:4000; sc-2020; Santa Cruz, USA).

For TEM, sEVs isolated from 200 μL of canine serum were diluted in 200 μL of fixative solution (1% cacodylate, 2% glutaraldehyde, and 2% paraformaldehyde at pH 7.2-7.4) and maintained for 2 h at room temperature. Subsequently, the sEVs were diluted in 2 mL of 1X $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free PBS, and the solution was centrifuged once to obtain the sEVs pellet ($119,700 \times g$, 70 min, 4°C). The pellet was diluted in 100 μL buffer solution (1% cacodylate) and refrigerated until analysis. The sEV solution was placed on a copper grid for 20 min at room temperature, and 2% uranyl acetate was added. The morphology of the sEVs was analyzed using TEM.

4.5. Total RNA extraction, reverse transcription, and Real-Time PCR

The total RNA content of the sEVs, including miRNAs, was extracted with the TRIzol reagent and, with the addition of 1.33 μL of the GlycoBlue coprecipitator to the aqueous phase before RNA precipitation, as previously described by da Silveira *et al.* with minimal modifications. The samples were then analyzed by spectrophotometry to verify the quantity and quality of the extracted RNA. RNA samples were treated with DNase I.

To analyze the expression of miRNAs in sEVs, reverse transcription was performed for cDNA synthesis using the commercial kit MystiCq MicroRNA cDNA Synthesis Mix, according to the manufacturer's instructions. Using 70 ng of total RNA (per sample), quantitative RT-PCR was performed using the MystiCq Universal PCR Primer kit, according to the manufacturer's instructions. Reactions of 6 μ L were performed containing 2x MystiCq microRNA SYBR Green qPCR ReadyMix, 10 μ M MystiCq Universal PCR Primer, nuclease-free water, 0.7 ng cDNA, and 1 μ L primer, designed according to the miRNA sequences (miR- 26b, miR-132, and miR-155) available from the miRBase database (Table 5). The relative level of each miRNA in each sample was assessed, and the plates were mounted using an electronic multichannel pipetting system. Amplification was performed using the QuantStudio 6 Flex (Thermo Fisher Scientific, USA). The temperatures and times used were 95°C for 2 min for activation of HotStarTaq DNA Polymerase and initiation of denaturation of the cDNA strands, followed by 45 cycles of 95°C for 5 s for denaturation, 60°C for 15 s for annealing of the primers, and 70°C for 15 s for extension, when fluorescence capture occurred. miRNAs were considered present when they presented a cycle threshold (CT) lower than 35 in at least three biological replicates and an appropriate melting curve. CT values were normalized using the geometric mean CT of the endogenous genes RNT43snoRNA and ssc-miR-99b. Relative expression values were calculated using the Δ Ct method, and normalized data were transformed using $2^{-\Delta Ct}$ for graphical representation of relative transcriptional levels (38).

miRNAs	Primer sequences
miR-26b	TTCAAGTAATTCAGGATAGGTT
miR-155	TTAATGCTAATTGTGATAGGGG
miR-132	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG
miR-99b	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG
RNT43 snoRNA	CTTATTGACGGGCGGACAGAAAC

Table 5. Primer sequences of miRNAs analyzed by RT-PCR

4.6. Statistical analysis

Laboratory tests for screening, size and concentration of sEVs, and expression of miRNAs were subjected to descriptive statistical analysis and the results were

presented as mean and standard error of the mean (parametric data) or median with minimum and maximum values (non-parametric data). Mean values for age, hematological and biochemical parameters, size and concentration of sEVs, and expression of miRNAs of the three groups (control, obese, and obese with alteration) were subjected to ANOVA, and compared using Tukey's test. BCS and weight medians were compared using the Mann-Whitney test. Comparisons between the two groups (obese and control) were performed using an unpaired t-test ($p < 0.05$). PCA was performed with the obese and control groups and the variables used were serum triglyceride concentration and concentration of sEVs. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism version 8.

REFERENCES

- 1 Clark, M., & Hoenig, M. Metabolic effects of obesity and its interaction with endocrine diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* **46**, 797-815 (2016).
- 2 Izaola, O., Luis, D. D., Sajoux, I., Domingo, J. C., & Vidal, M. Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutr Hosp.* **31**, 2352-2358 (2015).
- 3 Pardo, F., Villalobos-Labra, R., Sobrevia, B., Toledo, F., & Sobrevia, L. Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Mol. Asp. Med.* **60**, 81-91 (2018).
- 4 Camino, T. *et al.* Deciphering adipose tissue extracellular vesicles protein cargo and its role in obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9366 (2020).
- 5 Théry, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* **7**, 1535750 (2018).
- 6 Kim, A., Shah, A. S., & Nakamura, T. Extracellular vesicles: a potential novel regulator of obesity and its associated complications. *Children.* **5**, 152 (2018).
- 7 Aguilera-Rojas, M., Badewien-Rentzsch, B., Plendl, J., Kohn, B., & Einspanier, R. Exploration of serum- and cell culture-derived exosomes from dogs. *BMC Vet. Res.* **14**, 1-9 (2018).
- 8 Arner, P., & Kulyte, A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* **11**, 276-288 (2015).

- 9 Zhuang, G. *et al.* A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity associated adipose tissue inflammation. *Circulation*. **125**, 2892-2903 (2012).
- 10 Yam, P. S. *et al.* Impact of canine overweight and obesity on health-related quality of life. *Prev Vet Med*, **127**, 64-69 (2016).
- 11 Porsani, M. Y. H. *et al.* Prevalence of canine obesity in the city of São Paulo, Brazil. *Sci. Rep.* **10**, 1-15 (2020).
- 12 Mendivil-Alvarado, H., Sosa-León, L. A., Carvajal-Millan, E., & Astiazaran-Garcia, H. Malnutrition and Biomarkers: A Journey through Extracellular Vesicles. *Nutrients*. **14**, 1002, (2022)
- 13 Eikelis, N. *et al.* MicroRNA-132 may be associated with blood pressure and liver steatosis—preliminary observations in obese individuals. *J. Hum. Hypertens.* 1-6 (2021).
- 14 Mulder, N. L., Havinga, R., Kluiver, J., Groen, A. K., & Kruit, J. K. AAV8-mediated gene transfer of microRNA-132 improves beta cell function in mice fed a high-fat diet. *J. Endocrinol.* **240**, 123-132 (2019).
- 15 Klöting, N. *et al.* MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PloS one*. **4**, e4699 (2009).
- 16 Li, G. *et al.* miR-26b promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through targeting PTEN. *DNA Cell Biol.* **6**, 672-681 (2017).
- 17 Johnson, M. C. Hyperlipidemia disorders in dogs. *Compendium*. **27**, 361-370 (2005).
- 18 Xenoulis, P. G., & Steiner, J. M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *Vet J.* **183**, 12-21 (2010).
- 19 Usui, S., Yasuda, H., & Koketsu, Y. Lipoprotein cholesterol and triglyceride concentrations associated with dog body condition score; effect of recommended fasting duration on sample concentrations in Japanese private clinics. *J Vet Med Sci.* **77**, 1063–1069 (2015).
- 20 Jericó, M. M., Lorenzini, F., Kanayama, K. K., Cavalcante, C. Z., & Furtado P. V. *Obesidade Canina e Felina. Associação Brasileira de Endocrinologia Veterinária (ABEV)* <https://docplayer.com.br/136370698-Obesidade-canina-e-felina.html> (2018).
- 21 Piantedosi, D. *et al.* Serum biochemistry profile, inflammatory cytokines, adipokines and cardiovascular findings in obese dogs. *Vet J.* **216**, 72-78 (2016).
- 22 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 Vet. Res.* **10**, 1-8 (2014).

- 23 German, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats. *J. Nut.* **136**, 1940S-1946S (2006).
- 24 Diez, M. *et al.* Evolution of blood parameters during weight loss in experimental obese Beagle dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr.* **88**, 66-171 (2004).
- 25 Jeusette, I. C., Lhoest, E. T., Istasse, L. P., & Diez, M. O. Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **66**, 81-86 (2005).
- 26 Kobayashi, Y. *et al.* Circulating extracellular vesicles are associated with lipid and insulin metabolism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **315**, E574-E582 (2018).
- 27 Fernández-Hernando, C., Suárez, Y., Rayner, K. J., & Moore, K. J. MicroRNAs in lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 86 (2011)
- 28 Engin, A. B. MicroRNA and adipogenesis. *Obesity and lipotoxicity.* **960**, 489-509 (2017).
- 29 Hanin, G. *et al.* miRNA-132 induces hepatic steatosis and hyperlipidaemia by synergistic multitarget suppression. *Gut.* **67**, 1124-1134 (2018).
- 30 Song, G. *et al.* The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation. *Gene.* **533**, 481-487 (2014).
- 31 Acharya, A. *et al.* miR-26 suppresses adipocyte progenitor differentiation and fat production by targeting Fbxl19. *Genes Dev.* **33**, 1367-1380 (2019).
- 32 Xu, G. *et al.* Obesity-associated microRNA-26b regulates the proliferation of human preadipocytes via arrest of the G1/S transition. *Mol. Med. Rep.* **12**, 3648-3654 (2015).
- 33 Laflamme, D. R. P. C. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Prac.* **22**, 10-15 (1997).
- 34 Lässer, C., Eldh, M., Lötval, J. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J. Vis. Exp.* **59**, e3037 (2012).
- 35 de Ávila, A. C. F. C. M. *et al.* Estrous cycle impacts microRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* **102**, 362-375 (2020).
- 36 da Silveira, J. C. *et al.* Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. *PLoS One.* **12**, e0179451 (2017).
- 37 Gonella-Díaz, A. M. *et al.* Steroidal regulation of oviductal microRNAs is associated with microRNA-processing in beef cows. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 953 (2021).

CAPÍTULO 4. MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E ANÁLISE DO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CADELAS OBESAS: microRNAs, MARCAÇÃO PARA MACRÓFAGOS E HISTOMORFOMETRIA

Paola Caroline da Silva Nunes¹, Rosane Mazzarella¹, Camila Stanquini¹, Mariana Cardoso Sanches¹, Wellington Henrique Bessi¹, Natália Goulart Leite¹, Lucas de Souza Oliveira¹, Ricardo de Francisco Strefezzi¹, Juliano Coelho da Silveira¹, Deise Carla Almeida Leite Dellova¹.

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo
Pirassununga, SP

RESUMO

A obesidade é caracterizada pela expansão do tecido adiposo, que se dá tanto pela produção de novas células de gordura (hiperplasia), quanto pelo aumento do volume das células pré-existentes (hipertrofia). Durante esse processo o tecido sofre hipoperfusão sanguínea e hipóxia resultando numa inflamação local e a composição celular do tecido adiposo é alterada, principalmente pelo número de infiltrado de macrófagos. O tecido adiposo é um órgão metabólico e endócrino, tendo seus adipócitos a capacidade de sintetizar e secretar vesículas extracelulares (VEs), permitindo assim a comunicação intercelular. Os miRNAs contidos em VEs e tecidos tem a capacidade de regular a expressão gênica, sendo que os miR-132, miR-26b e miR-155 foram associados com obesidade, infiltração de macrófagos e inflamação. O objetivo desse estudo foi analisar marcadores de inflamação e uma possível relação entre o estado inflamatório, as VEs séricas e os miRNAs alvos expressos nas VEs séricas e no tecido adiposo de cadelas obesas. Para isso, foram recrutadas 20 cadelas castradas em bom estado geral, sendo 14 obesas e 6 controles. As VEs pequenas foram isoladas a partir do sangue total, por meio de centrifugações e ultracentrifugações seriadas e o equipamento NanoSight foi utilizado para a determinação do tamanho e concentração das VEs pequenas presentes no soro. Os miRNAs foram extraídos das VEs pequenas e do tecido adiposo e analisados pela técnica de PCR em tempo real. A análise da expressão dos genes também foi realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real. As cadelas obesas apresentaram hipertrofia do tecido adiposo subcutâneo. Não foram observadas alterações nos marcadores inflamatórios (contagem de leucócitos, proteína C reativa e fibrinogênio) e os grupos não diferiram com relação: 1) ao tamanho e concentração das VEs e, 2) à expressão dos miR-26b, miR-155 e miR-132 contidos nas VEs. Os grupos também não diferiram com relação à expressão desses miRNAs e seus genes alvo (MYCBP, SOCS1 e FOXO3) no tecido adiposo subcutâneo, assim como o infiltrado de macrófagos, mesmo as cadelas obesas apresentando numericamente maior infiltrado de macrófagos no tecido. Os resultados indicam que apesar das cadelas obesas apresentarem hipertrofia do tecido adiposo e maior contagem numérica dos macrófagos, o processo inflamatório não foi caracterizado e com isso, possivelmente não foi observado alterações nos miRNAs das VEs, do tecido adiposo, assim como os genes alvo.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma condição complexa definida pelo excesso de acúmulo de tecido adiposo corporal devido um consumo energético positivo prolongado. Em animais de companhia o desequilíbrio nutricional tem sido a principal causa de obesidade, sendo que o excesso de peso pode acarretar diversas doenças como distúrbios metabólicos, resistência à insulina, hiperlipidemia e alterações ortopédicas (MACEDO et al., 2022; RAFFAN, 2022).

Pesquisas identificaram que cães obesos apresentam alterações sistêmicas e laboratoriais compatíveis com inflamação, que poderiam justificar algumas das comorbidades decorrentes do excesso de gordura corporal (TROPF et al., 2017; XU et al., 2015). Alterações hematológicas já foram relatadas em cães obesos clinicamente saudáveis, ou seja, sem nenhuma outra manifestação clínica, além do acúmulo de gordura corporal. Nestes cães observou-se o aumento da contagem de leucócitos e da concentração de proteínas plasmáticas (RADAKOVICH et al., 2017). Rafaj et al. (2016) também relataram o aumento da contagem de plaquetas em cães obesos, em comparação com cães magros. O conjunto destas alterações poderia ser explicada pelo processo inflamatório decorrente da obesidade.

O tecido adiposo é formado por adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos, macrófagos e linfócitos T. Este tecido exerce suas funções sobre os sistemas orgânicos por meio da secreção de fatores de crescimento, hormônios e citocinas. As citocinas são polipeptídios que regulam a função imunológica e inflamatória, uma vez que estimulam a proliferação e diferenciação celular e promovem quimiotaxia e secreção de imunoglobulinas. No tecido adiposo são denominadas adipocinas (IZAOLA et al., 2015). Aparentemente, o tecido adiposo é o sítio primário da inflamação associada à obesidade, devido a sua expansão e aumento da atividade secretora. Durante o remodelamento dinâmico ou expansão, o tecido sofre as consequências da hipoperfusão sanguínea e hipóxia, que resultam em uma inflamação local devido à ação das adipocinas inflamatórias e fatores quimiotáticos (GE et al., 2014; IZAOLA et al., 2015). Além disso, na obesidade a composição celular do tecido adiposo é alterada, principalmente, pelo infiltrado de um grande número de macrófagos, que têm a função de remover as células apoptóticas (SCARPELLINI; TACK, 2012).

Quando ocorre um balanço energético positivo, caracterizado pelo maior consumo e menor gasto de energia, inicia-se o acúmulo de tecido adiposo no subcutâneo e, posteriormente, nas vísceras (IZAOLA et al., 2015). A expansão do tecido adiposo ocorre tanto pela produção de novas células de gordura (hiperplasia), quanto pelo aumento do volume das células pré-existentes (hipertrofia) (ARNER; KULYTÉ, 2015) e possivelmente pode alterar a síntese e a liberação de vesículas extracelulares (VEs) nesse tecido.

As VEs são produzidas em diferentes células e secretadas para o meio extracelular, sendo possível sua comunicação com diversos órgãos. Por estarem presente no meio extracelular, podem ser detectadas em todo tipo de fluido corporal, como sangue, urina, saliva, líquido cefalorraquidiano, entre outros (CAMINO et al., 2020). As VEs contêm elementos da sua célula de origem como, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (mRNAs, tRNAs e microRNAs). Dessa forma agem como transportadores de informação biológica uma vez que realizam comunicação intercelular podendo modificar a função de órgãos receptores (KIM; SHAH; NAKAMURA, 2018). Ge et al. (2014) propuseram que os macrófagos e os adipócitos hipertrofiados são os principais envolvidos no processo inflamatório desencadeado pela obesidade e que as vesículas secretadas pelos adipócitos poderiam atuar como “comunicadores da inflamação” entre os adipócitos e os macrófagos teciduais ou circulantes.

Os microRNAs (miRNAs) correspondem a um grupo altamente conservado de pequenos RNAs não codificantes, com aproximadamente 22 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica. Por estarem presentes nos tecidos, os miRNAs podem ser encontrados na circulação, como o conteúdo de VEs (ARNER; KULYTÉ, 2015; ZHUANG et al., 2012). Devido à relação entre obesidade, expansão do tecido adiposo e inflamação, a expressão dos miRNAs no tecido adiposo branco tem sido muito estudada em humanos, principalmente, dos miRNAs que modulam a resposta inflamatória (GE et al., 2014).

Os miR-132, miR-26b e miR-155 são miRNAs associados com obesidade, metabolismo lipídico, adipogênese, infiltração de macrófagos e inflamação, secreção de insulina, entre outros (EIKELIS et al., 2021; MULDER et al., 2019; KLÖTING et al., 2009). A expressão desses miRNAs pode estar associada com a modulação do processo inflamatório em cadelas obesas, visto que em humanos foi encontrado uma

correlação negativa com a expressão de macrófagos no tecido adiposo de humanos obesos (KLÖTING et al., 2009). Não foram encontrados estudos sobre a expressão de miRNAs que modulam a resposta inflamatória em cães obesos, no entanto os miR-132, miR-26b e miR-155 já foram descritos na espécie canina. A ação desses miRNAs pode ser explicada por meio da identificação de seus genes alvo, que terão a transcrição reprimida ou o RNAm degradado. Sendo assim, o miR-26b atuaria sobre o gene MYCBP, o miR-155 teria ação sobre o gene SOCS1 e o miR-132 teria como alvo o gene FOXO3 (LI et al., 2018; ESSANDOH et al., 2016; BYEON et al., 2017).

Evidências de um processo inflamatório em cães com acúmulo de gordura corporal já foram relatadas na literatura (FRANK et al., 2015; RAFAJ et al., 2016; XU et al., 2015; TROPF et al., 2017). Entretanto, a análise do infiltrado de macrófagos e da expressão de miRNAs que poderiam regular este processo ainda não foi estudada em caninos obesos.

Os objetivos desse estudo foram avaliar marcadores de inflamação na circulação; o padrão de VEs séricas, assim como a expressão do miR-26b, miR-132 e miR-155 nessas vesículas; a marcação imuno-histoquímica para macrófagos e os níveis de transcritos dos miR-26b, miR-155 e miR-132 no tecido adiposo subcutâneo, além da expressão dos genes alvos do miR-26b, miR-155 e miR-132 e a histomorfometria no tecido adiposo subcutâneo de cadelas obesas e com escore de condição corporal (ECC) normal.

2. METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido na Unidade Didática Clínico Hospitalar (UDCH) da FZEA-USP, em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas, Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT/ZMV), no campus Fernando Costa, em Pirassununga-SP. O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FZEA/USP (Protocolo CEUA: 1940130519).

O experimento foi realizado em 20 fêmeas caninas de diferentes raças e os critérios de inclusão foram: idade entre três e oito anos, castradas, em bom estado geral e ECC 4 ou 5 (grupo controle) e ECC 8 ou 9 (grupo obeso). As cadelas foram divididas em grupo controle, formado por 6 cadelas com ECC 5 e grupo obeso, formado por 14 cadelas com ECC 8 e 9, apresentando obesidade decorrente da

ingestão excessiva de alimentos (balanço energético positivo) há pelo menos 1 ano. Não participaram deste estudo cadelas obesas com sinais clínicos ou alterações em exame físico e laboratorial característicos de doenças endócrinas (diabete mellitus, hipotireoidismo e hiperadrenocorticism) ou que apresentassem outras doenças graves associadas, como por exemplo, neoplasias.

2.1. Exame físico e exames laboratoriais de triagem

O exame físico geral foi realizado conforme proposto por Feitosa (2004) e a avaliação do ECC foi realizada de acordo com o proposto por Laflamme (1997). As cadelas foram submetidas à coleta de sangue por venopunção jugular, após 12h de jejum alimentar, para os exames laboratoriais e análise das VEs. A colheita de urina foi através de micção espontânea ou cistocentese.

O hemograma foi realizado usando um analisador de sangue automatizado BC-2800Vet (Mindray Bio-Medical Electronics Co., Shenzhen, China). Os parâmetros bioquímicos séricos (perfil hepático e renal) foram avaliados com reagentes específicos (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brasil) e um analisador bioquímico BS-120 (Mindray Bio-Medical Electronics Co.). A urinálise incluiu a análise com tira reagente (Labtest Diagnóstica) e o exame de sedimentos.

2.2. Dosagem hormonal e ultrassom

Devido à possibilidade de obesidade relacionada à hipotireoidismo ou hiperadrenocorticism, foram realizados em todas as cadelas obesas dois testes de triagem: teste hormonal T4 livre por diálise de equilíbrio pela metodologia de radioimunoensaio (realizado em um laboratório veterinário de referência) e exame ultrassonográfico das glândulas adrenais (realizado no setor de diagnóstico por imagem do hospital veterinário da instituição).

O exame ultrassonográfico é considerado um grande auxiliar na avaliação das glândulas adrenais e no diagnóstico de possíveis alterações (SCHULTZ et al., 2009; D'ANJOU; PENNINGK, 2015; NYLAND; MATTOON., 2015). Utilizando o aparelho My Lab 30 Vet Gold (Esaote, Génova, Itália) com transdutores microconvexo e linear multifrequenciais, as cadelas foram colocadas em decúbito lateral (bilateralmente). As glândulas adrenais foram identificadas a partir de suas referências vasculares, a

adrenal direita teve seu polo caudal visibilizado adjacente à veia cava caudal, enquanto a adrenal esquerda teve como referência o segmento abdominal da aorta e as veias e artérias renais esquerdas.

A avaliação das glândulas adrenais foi feita em relação ao seu padrão de ecogenicidade, ecotextura, formato, nível de dificuldade perante a sua visibilização e, se foi possível observá-la em sua totalidade ou parcialmente numa mesma imagem. Essas imagens foram realizadas ao corte longitudinal. Para confirmar a caracterização das estruturas visibilizadas como glândulas adrenais, foram pesquisadas suas referências vasculares por meio do Doppler colorido, através da identificação de veia e/ou artéria frenicoabdominais envolvendo externamente a região média das glândulas e/ou da veia medular disposta longitudinalmente na região medular das glândulas adrenais. Com os polos caudais identificados, foram realizadas medidas em triplicata da altura do polo caudal em sua maior espessura (CHALUS et al., 2013; SOULSBY et al., 2015).

2.3. Marcadores de inflamação

Além da avaliação da contagem total e diferencial dos leucócitos, foi realizada a determinação sérica da proteína C reativa e da concentração plasmática de fibrinogênio nas cadelas dos grupos controle e obeso. Para proteína C reativa, o soro obtido foi armazenado a -80°C e posteriormente encaminhado para um laboratório de referência veterinário, sendo analisada através da metodologia imunoensaio enzimático. Para a determinação da concentração de fibrinogênio, as amostras de sangue total foram transferidas para tubos com citrato de sódio e o soro obtido foi analisado pela técnica de formação de coágulos – tempo de trombina Clauss (RAFAJ et al., 2016), utilizando *kit* comercial (Labtest Diagnóstica).

2.4. Análise das VEs pequenas

Amostras de sangue foram centrifugadas (2.400 rpm, durante 30 minutos) para a obtenção do soro. Após, passaram por três centrifugações consecutivas a 4°C: 300 x g por 10 minutos; 2.000 x g por 10 minutos; 16.500 x g por 30 minutos, para remoção de células, debris celulares e vesículas grandes, respectivamente. O sobrenadante foi armazenado à -80°C para posterior ultracentrifugação.

As amostras foram descongeladas e os sobrenadantes foram filtrados usando um filtro de seringa com membrana de polietersulfona (PSE) e poro 0.20 µm (Corning, Arizona, EUA) para o isolamento das VEs pequenas a fim de remover quaisquer VEs grandes. Em seguida, foi submetido à duas ultracentrifugações consecutivas de 119.700 x g, durante 70 minutos a 4°C (Optima XE-90 Ultracentrifuge; rotor 70 Ti; Beckman Coulter, Califórnia, EUA), de acordo com o protocolo previamente descrito (LÄSSER; ELDH; LOTVALL, 2012).

O pellet resultante foi ressuspenso em 50 µL de solução salina tamponada com fosfato (1X Ca²⁺/Mg²⁺). A análise rastreamento de nanopartículas para caracterizar as VEs pequenas de acordo com o tamanho e concentração de partículas, foi realizada no equipamento NanoSight NS300, modelo NS300 (Malvern Panalytical, Cambridge, Reino Unido). Para leitura, foram feitos três vídeos consecutivos de 30 segundos para cada amostra diluída (1:100 em solução salina tamponada com fosfato) e capturados pela câmera sCMOS em Camera Level 13 e temperatura controlada de 38,5°C. Considerando threshold level 5, as imagens foram rastreadas pelo software analítico NanoSight NTA 3.4 (Malvern Panalytical), conforme descrito por de Ávila et al. (2020).

2.5. Biópsia tecido adiposo subcutâneo

As cadelas foram recrutadas para a biópsia, mediante autorização dos tutores. O exame eletrocardiográfico foi realizado antes do procedimento cirúrgico. Para a biópsia, as cadelas foram submetidas à medicação pré-anestésica: acepromazina (0,05 mg/kg) e petidina (5 mg/kg) por via intramuscular, induzidas com cetamina S+ (8 mg/kg) e midazolam (0,25 mg/kg) por via intramuscular e anestesiadas com sevoflurano (anestesia inalatória). No centro cirúrgico, foram posicionadas em decúbito dorsal e a incisão cutânea (5 cm) foi feita na linha mediana, 2 cm caudalmente à cicatriz umbilical, após tricotomia e assepsia prévias. Mediante uma divulsão delicada, um fragmento de 2x2 cm do tecido adiposo subcutâneo foi removido. A sutura de pele foi realizada com fio poligalactina 3-0 e pontos simples separados. No pós-operatório, as cadelas foram medicadas com anti-inflamatório meloxicam (0,1 mg/kg). O curativo da ferida cirúrgica foi realizado com rifamicina spray e micropore. As cadelas permaneceram com roupa cirúrgica durante 5 dias, até cicatrização completa da ferida.

Metade do fragmento removido foi fixado em paraformaldeído (4%) e depois embocado em parafina para a análise da marcação imuno-histoquímica para macrófagos (KLÖTING et al., 2009) e a outra metade foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C até o momento da análise da expressão dos miRNAs e de seus genes alvo (URIBE et al., 2016).

2.6. Marcação imuno-histoquímica para macrófagos M1 no tecido adiposo

As amostras de tecido adiposo subcutâneo foram condicionadas em cassetes e fixadas com solução de formalina tamponada a 10% durante 24 horas. No processo de desidratação, os tecidos foram mergulhados em álcool etílico com concentrações crescentes até atingirem o álcool absoluto, correspondente a 99% de pureza (CINTI et al., 2005). Na etapa de clarificação, com o uso de xilol, o álcool foi removido dos tecidos tornando-se transparentes, facilitando assim a imersão deles em parafina (CAMILLO et al., 2017). As amostras foram seccionadas no micrótomo tendo os cortes finais a espessura de 3 µm e corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina para evidenciação dos macrófagos citoplasmáticos.

A recuperação antigênica foi realizada em citrato pH 6.0, em panela de pressão, por 3 minutos, seguido de resfriamento durante 10 minutos no próprio tampão. Foram realizadas três lavagens com solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) durante 5 minutos cada, com adição de detergente Tween 20 a 1%, após o resfriamento. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da solução de peróxido de hidrogênio a 7%, durante 30 minutos, em temperatura ambiente, seguindo-se de três lavagens com solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) por 5 minutos cada. Os cortes histológicos foram delimitados com caneta hidrofóbica e posteriormente as amostras foram submetidas a incubação com anticorpo primário, policlonal de coelho, Anti-iNOS (clone bs-2072R, Geistlich Bio-Oss, São Paulo, Brasil) para marcação de macrófagos M1, na diluição 1:100, por 18 horas, em câmara úmida, à temperatura de 4°C.

Após 18 horas de incubação as amostras foram lavadas novamente com solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) por 3 vezes durante 5 minutos e, posteriormente, incubadas durante 30 minutos com o anticorpo secundário Easylink ONE (Easy Path, São Paulo, Brasil) conforme indicação do fabricante, visando amplificar a reação. Foram realizadas mais três lavagens de 5 minutos com solução

salina tamponada com fosfato (pH 7,4) e, para revelação da reação, adicionou-se às amostras o cromógeno diaminobenzidina (Easy Path, São Paulo, Brasil) por 30 segundos e, subsequente duas lavagens de 5 minutos em água destilada, seguido de contra coloração com Hematoxilina de Harris e lavagem em água corrente.

Realizou-se desidratação em álcoois graduados e diafanização em banhos de xilol, seguida pela montagem com lamínula. As lâminas de controle negativo foram incubadas com o mesmo anticorpo secundário e processadas simultaneamente, com a mesma diluição e tempo, para confirmar a especificidade do anticorpo primário. As células marcadas foram identificadas no microscópio Nikon eclipse E200 (Nikon, Tóquio, Japão) por exame visual cuidadoso das lâminas com graus crescentes de ampliação. O número de macrófagos foi contabilizado em três áreas escolhidas aleatoriamente com aumento de 40x.

2.7. Histomorfometria do tecido adiposo subcutâneo

Após fixação em paraformaldeído (4%), os fragmentos de tecido adiposo foram emblocados em parafina para realização dos cortes histológicos. Os cortes foram feitos com 5µm de espessura com uso de micrótomo (RM2245, Leica Microsystems GmbH, Braunschweig Alemanha). Após, foram fixados em lâminas silanizadas StarFrost (Waldemar Knittel Glasverarbeitung GmbH, Braunschweig Alemanha) e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina, de forma adaptada ao protocolo descrito por Berry et al. (2014).

As lâminas histológicas foram observadas em microscópio óptico (DM500, Leica Microsystems GmbH, Braunschweig, Alemanha) e dois campos aleatórios e não sobrepostos de cada lâmina foram fotografados em campo de aumento de 10X por meio de uma câmera (ICC50HD, Leica Microsystems GmbH, Braunschweig, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico, com auxílio do software Leica LAS EZ (Leica Microsystems GmbH). Todas as etapas de preparação e análise do material foram realizadas pelo mesmo indivíduo, sendo que este desconhecia a quais grupos experimentais cada amostra pertencia.

O software utilizado para a determinação do número e área dos adipócitos foi o Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Maryland, Estados Unidos). Inicialmente, o software foi calibrado para o aumento microscópico de 10X, transformando assim os *pixels* da imagem em micrômetros, na proporção correta.

Então, cada fotografia obtida previamente foi analisada de acordo com essa calibração. As células foram delimitadas manualmente e individualmente, sendo que adipócitos rompidos, sobrepostos ou excessivamente deformados foram desconsiderados. Feito isso, o número de adipócitos foi dado como a soma de todos os adipócitos do campo, e suas respectivas áreas foram dadas como: área x 10^3 x μm^2 . Os dados foram tabulados e então foi calculado o valor médio do número de adipócitos e o valor médio da área dos adipócitos entre os dois campos fotografados de uma mesma amostra, sendo que este valor médio foi utilizado para as análises estatísticas.

2.8. Extração de RNA total, transcriptase reversa e PCR em tempo real

O conteúdo de RNA total do tecido adiposo e das VEs pequenas, incluindo os miRNAs, foi extraído com o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e, com a adição de 1,33 μL do coprecipitador GlycoBlue (Thermo Fisher Scientific) à fase aquosa antes da precipitação do RNA, conforme previamente descrito por da Silveira et al. (2017) com modificações mínimas. Em seguida, as amostras foram analisadas por espectrofotometria (NanoDrop™ One/One^C, Thermo Fisher Scientific) a fim de verificar a quantidade e a qualidade do RNA extraído. O RNA foi tratado com DNaseI (Invitrogen; Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a análise da expressão dos miRNAs das VEs pequenas e do tecido adiposo, foi realizada, a partir da síntese de cDNA, a transcrição reversa utilizando o kit comercial MystiCq MicroRNA cDNA Synthesis Mix (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) de acordo com as instruções da empresa. Utilizando 70 ng do RNA total (por amostra) a técnica de PCR quantitativo foi realizada com o kit MystiCq Universal PCR Primer (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções da empresa. Foram feitas reações de 6 μL contendo 2x MystiCq microRNA SYBR Green qPCR ReadyMix, 10 μM MystiCq Universal PCR Primer, Nuclease-free water, 0,7 ng de cDNA, e 1 μL de primer, desenhados de acordo com as sequências de miRNAs (miR-26b, miR-132 e miR-155) disponíveis no miRBase database (Tabela 1). O nível relativo de cada miRNA foi avaliado em cada amostra e as placas foram montadas usando um sistema de pipetagem multicanal eletrônico. As amplificações foram realizadas no QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA). As temperaturas e tempos utilizados

foram 95°C por 2 minutos para ativação da HotStarTaq DNA Polymerase e início da desnaturação das fitas de cDNA seguido de 45 ciclos de 95°C durante 5 segundos para desnaturação, 60°C durante 15 segundos para anelamento dos primers e 70°C durante 15 segundos para extensão, quando ocorre a captação da fluorescência. Os miRNAs foram considerados presentes quando apresentaram cycle threshold (CT) menor que 35 em pelo menos três repetições biológicas e curva de melting apropriada. Os valores de CT foram normalizados usando a média geométrica de CT dos genes endógenos RNT43snoRNA e ssc-miR-99b. Os valores de expressão relativa foram calculados usando o método ΔC_t , e os dados normalizados foram transformados por $2^{-\Delta C_t}$ para representação gráfica dos níveis relativos de transcrição (GONELLA-DIAZA et al., 2021).

2.9. Expressão dos genes MYCBP, SOCS1 e FOXO3 no tecido adiposo

A partir de 170 ng (por amostra) do RNA total, o cDNA foi sintetizado por meio do kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, Califórnia, EUA). A análise da expressão dos genes foi realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real com o kit e GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), de acordo com as instruções da empresa. Os primers específicos para caninos dos genes MYCBP, SOCS1 e FOXO3 foram desenhados com o auxílio das sequências disponíveis na plataforma TargetScan (Tabela 1). O PCR em tempo real foi realizado usando o QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems) e com as seguintes condições do ciclo: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Os genes foram considerados presentes quando apresentaram cycle threshold (CT) menor que 35 em pelo menos três repetições biológicas e curva de melting apropriada. Os valores de CT foram normalizados usando a média geométrica de CT dos genes endógenos GAPDH e 18S. Os valores de expressão relativa foram calculados usando o método ΔC_t , e os dados normalizados foram transformados por $2^{-\Delta C_t}$ para representação gráfica dos níveis relativos de transcrição (GONELLA-DIAZA et al., 2021).

Tabela 1 - Sequência de primer da análise de genes e miRNAs

Gene	Sequência Primer (5'- 3')
MYCBP	S: ATCGCCATTACAAAGCCGC AS: ACCAATACCTTGGTCAGCGTCT
FOXO3	S: GGCGGGGTGGAAGAACTCTA AS: CTTCCCGCTCTTTCCCCCAT
SOCS1	S: AAGCCTGCGGCTTCTACTGG AS:GAAGAAGCAGTTCCGCTGGC
18S	S: CCTGCGGCTTAATTTGACTC AS: CTGTCAATCCTGTCCGTGTC
GAPDH	S: AGTGAAGCAGGCATCGGAGG AS: GGCGTCGAAGGTGGAAGAGT
miRNAs	Sequência Primer (5'- 3')
miR-26b	TTCAAGTAATTCAGGATAGGTT
miR-155	TTAATGCTAATTGTGATAGGGG
miR-132	TAACAGTCTACAGCCATGGTGC
miR-99b	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG
RNT43 snoRNA	CTTATTGACGGGCGGACAGAAAC

S: sense. AS: antisense. Fonte: Própria autoria

2.10. Análise dos resultados

Os resultados dos parâmetros avaliados foram tabulados e apresentados como média e erro padrão da média para dados paramétricos, e mediana com valores mínimos e máximos para dados não paramétricos. A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Os valores médios das variáveis foram submetidos ao teste t (grupo controle *versus* grupo obeso), tendo suas médias comparadas pelo teste Tukey e a medianas comparadas pelo teste Mann-Whitney. Os dados obtidos nas análises de tamanho e concentração de VEs pequenas, expressão de miRNAs e expressão dos genes alvo, foram testados para outliers e normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, comparados pelo teste *t-Student*. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software *GraphPad Prim 8* e foi considerado significativo valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Exame físico e laboratorial

Todas as fêmeas recrutadas possuíam parâmetros normais na avaliação clínica. Os grupos, controle e obeso não diferiram com relação à idade ($5,2 \pm 0,9$ versus $4,9 \pm 0,4$ anos, respectivamente) e ao peso (7,2 (5,2; 28,6) versus 12,1 (5,1; 46,8), respectivamente), mas o ECC foi maior no grupo obeso (8,5 (8; 9) versus 5,0 (5; 5) ($p < 0,0001$). Algumas características dos grupos podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Características dos grupos

Características	Grupo Controle (n=6) número de animais (%)	Grupo Obeso (n=14) número de animais (%)
Idade (anos)		
3 - 5	3 (50%)	9 (64,3%)
6 - 8	3 (50%)	5 (35,7%)
Peso (kg)		
0 - 6	2 (33,3%)	2 (14,3%)
7 - 10	3 (50%)	5 (35,7%)
11 - 20	0	3 (21,4%)
21- 30	1 (16,7%)	1 (7,2%)
> 30	0	3 (21,4%)
ECC		
5	6 (100%)	0
8	0	7 (50%)
9	0	7 (50%)
Raças		
Maltês	1 (16,7%)	1 (7,14%)
Lhasa Apso	1 (16,7%)	0
Shih-tzu	2 (33,3%)	3 (21,4%)
SRD	2 (33,3%)	4 (28,6%)
Dachshund	0	1 (7,14%)
Pointer Inglês	0	1 (7,14%)
Rottweiler	0	1 (7,14%)
Golden	0	2 (14,3%)
Cocker	0	1 (7,14%)

n= número de animais; SRD= sem raça definida. Fonte: Própria autoria

Os grupos não diferiram com relação ao eritrograma, leucograma e perfil bioquímico (Tabelas 3 e 4). No exame de urinálise as cadelas não apresentaram glicosúria e sinais de inflamação e/ou infecção.

Tabela 3 – Valores médios do eritrograma e leucograma

Parâmetros	Grupo Controle (n=6)	Grupo Obeso (n=14)	Valores de Referência ¹
Eritrócito ($10^6/\mu\text{L}$)	7,9 \pm 0,2	7,4 \pm 0,2	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g/dL)	18,8 \pm 0,5	18,2 \pm 0,4	12 - 18
Hematócrito (%)	52,0 \pm 1,1	51,4 \pm 1,3	37 - 55
PP(g/dL)	7,9 \pm 0,3	7,1 \pm 0,1	6 - 8
Plaquetas ($/\mu\text{L} \times 10^4$)	27,8 \pm 6,2	31,8 \pm 3,7	20 - 50
Leucócitos ($/\mu\text{L} \times 10^3$)	10,3 \pm 1,0	9,6 \pm 0,7	6 - 17
Neutrófilos ($/\mu\text{L} \times 10^3$)	6,8 \pm 0,9	6,1 \pm 0,5	3 - 11,5
Eosinófilos ($/\mu\text{L} \times 10^2$)	6,7 \pm 1,2	7,6 \pm 2,3	1 - 12,5
Linfócitos ($/\mu\text{L} \times 10^3$)	2,4 \pm 0,5	2,3 \pm 0,2	1 - 4,8
Monócitos ($/\mu\text{L} \times 10^2$)	3,9 \pm 1,2	4,3 \pm 0,8	1,5 - 13,5

n: número de animais por grupo; PP: proteína plasmática; \pm : erro padrão. 1THRALL et al., 2006. Fonte: Própria autoria.

Tabela 4 - Valores médios do perfil bioquímico

Parâmetros	Grupo Controle (n=6)	Grupo Obeso (n=14)	Valores de Referência ¹
Colesterol (mg/dL)	240,4 ± 31,2	210,7 ± 13,8	125 – 270
Triglicérides (mg/dL)	123,1 ± 37,3	97,1 ± 12,1	40 – 169
Glicose (mg/dL)	107,5 ± 5,9	111,5 ± 2,2	60 – 118
ALT (UI/L)	47,0 ± 10,4	66,0 ± 13,3	7 – 92
FA (UI/L)	126,2 ± 55,6	112,9 ± 49,3	10 – 96
GGT (UI/L)	5,0 ± 1,1	3,6 ± 0,8	1,2 – 6,4
Proteína Total (g/dL)	7,4 ± 0,3	6,6 ± 0,1	5,3 – 7,7
Albumina (g/dL)	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,05	2,3 – 3,8
Globulina (g/dL)	3,9 ± 0,3	3,1 ± 0,1	2,4 – 4,8
Bb Total (mg/dL)	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,1 – 0,7
Bb Direta (mg/dL)	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 – 0,3
Bb Indireta (mg/dL)	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,03	0,01 – 0,5
Ureia (mg/dL)	33,6 ± 3,8	35,7 ± 2,9	10 – 60
Creatinina (mg/dL)	1,0 ± 0,08	1,1 ± 0,04	0,5 – 1,6

ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamilttransferase; Bb: bilirrubina. n: número de animais por grupo. ±: erro padrão. ¹THRALL et al., 2006. Fonte: Própria autoria.

Os resultados individuais da concentração sérica de T4 livre nas cadelas do grupo obeso são apresentados no Anexo A.

3.2. Marcadores Inflamatórios

Não houve diferença entre os grupos com relação aos marcadores inflamatórios. Os dados podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5 - Marcadores inflamatórios

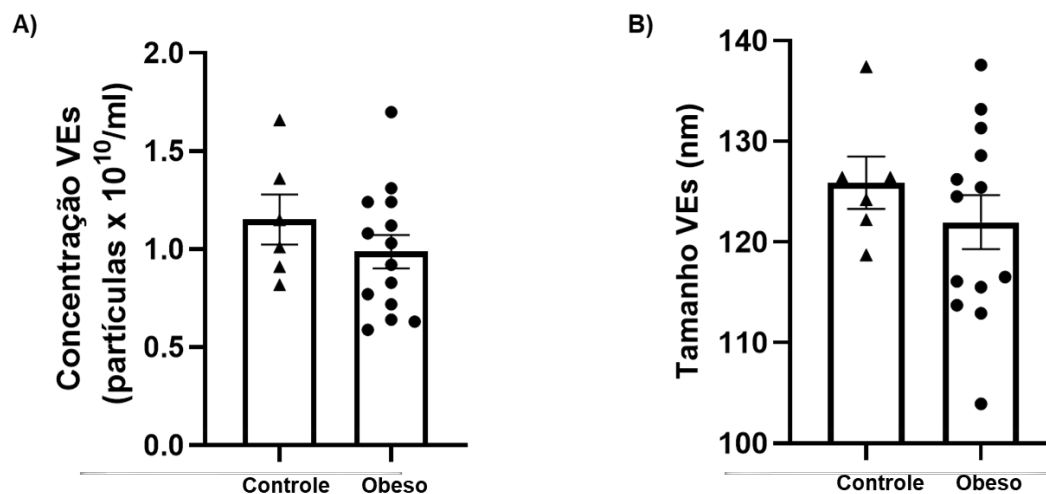
Parâmetros	Grupo Controle (n=6)	Grupo Obeso (n=14)	p-valor
Leucócitos ($\mu\text{L} \times 10^3$)	10,3 \pm 1,0	9,6 \pm 0,7	0,5902
Neutrófilos ($\mu\text{L} \times 10^3$)	6,8 \pm 0,9	6,1 \pm 0,5	0,7181
Fibrinogênio (mg/dL)	220,5 \pm 45,5	238,8 \pm 32,6	0,7791
PCR (mg/dL)	4,49 \pm 1,9	5,6 \pm 0,7	0,6618

n: número de animais por grupo; \pm : erro padrão. Fonte: Própria autoria.

3.3. VEs séricas e seus miRNAs

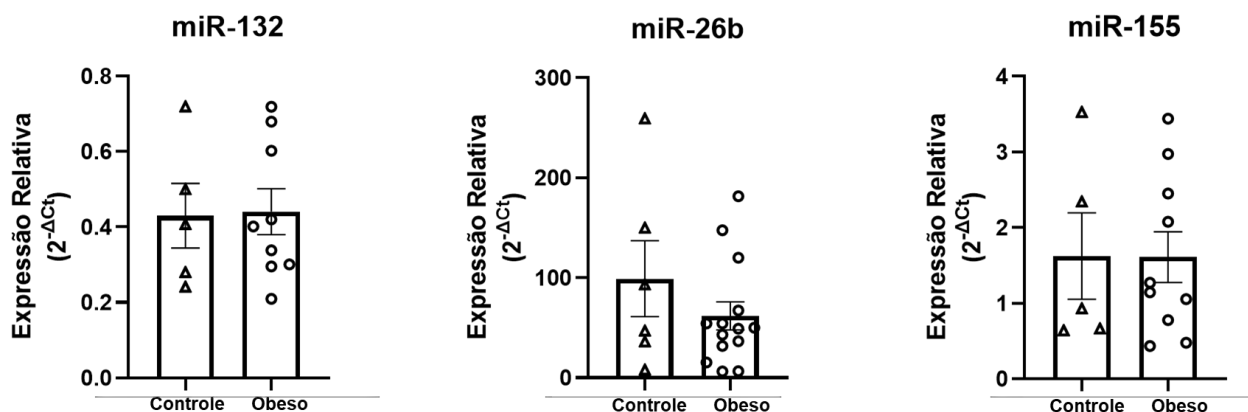
A análise das VEs pequenas séricas revelou que os grupos não apresentaram diferença com relação à concentração e ao tamanho das VEs pequenas (Figura 1), assim como seu conteúdo de miRNAs (Figura 2).

Figura 1 - Representação gráfica da concentração e tamanho das VEs pequenas séricas



Os gráficos ilustram valores individuais e médios (\pm erro padrão) da concentração de VEs pequenas (A) e do tamanho das VEs pequenas (B). Fonte: Própria autoria.

Figura 2 - Expressão relativa dos miRNAs presentes nas VEs pequenas séricas



Os gráficos ilustram valores individuais e médios (\pm erro padrão) do miR-132, miR-26b e miR-155 respectivamente. Fonte: Própria autoria.

3.4. Histomorfometria do tecido adiposo subcutâneo

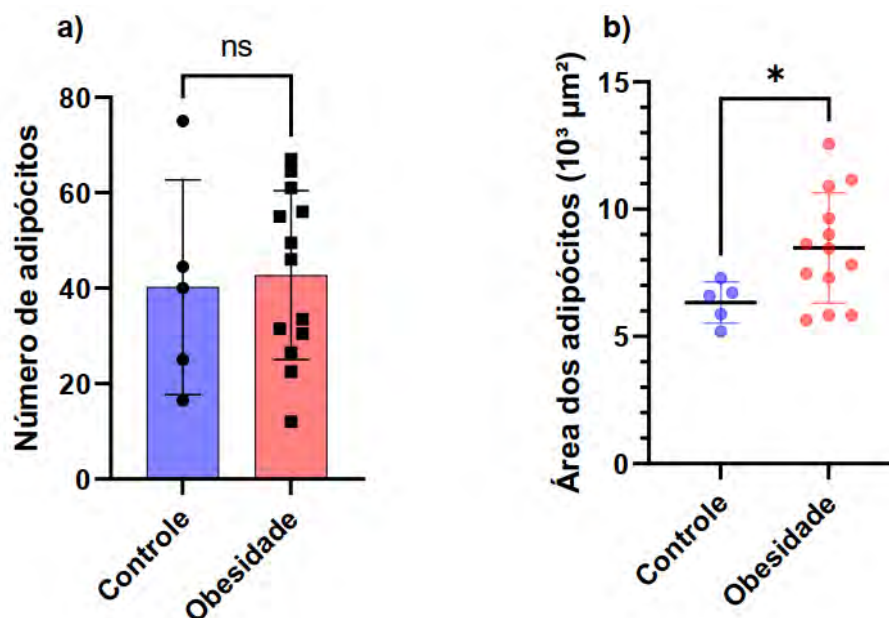
Com relação à histomorfometria, os grupos não apresentaram diferença quanto ao número médio de adipócitos, porém houve diferença quanto a área média dos adipócitos. Os resultados estão apresentados na Tabela 6 e Figuras 3, 4 e 5.

Tabela 6 - Valores médios do número e área dos adipócitos.

Parâmetros	Grupo Controle (n= 5)	Grupo Obeso (n=13)
Número de adipócitos	40,2 \pm 22,48	42,73 \pm 17,70
Área dos adipócitos (10 ³ x μm^2)	6,34 \pm 0,81	8,48 \pm 2,17*

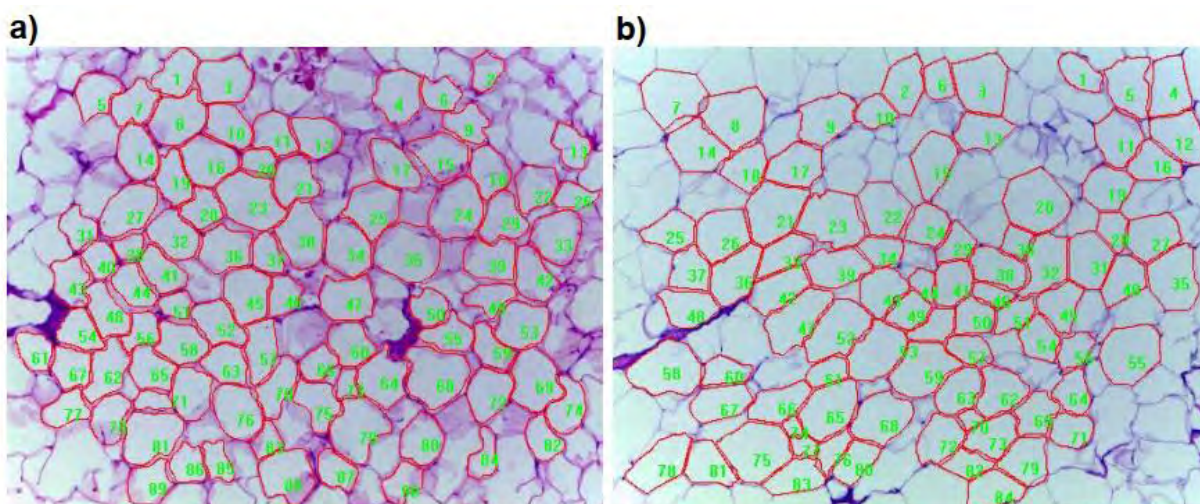
n: número de animais por grupo; \pm : desvio padrão; $p^*=0.0499$ versus grupo controle. Fonte: Própria autoria.

Figura 3 - Representação gráfica do número e área dos adipócitos no tecido adiposo subcutâneo para os grupos controle e obesidade



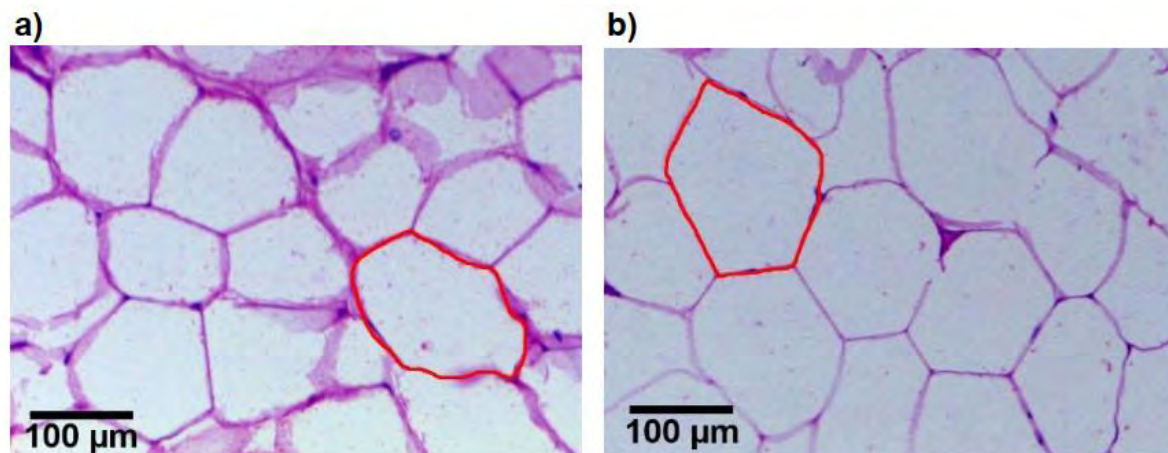
Comparação do número de adipócitos entre os grupos experimentais **(a)**; Comparação da área dos adipócitos entre os grupos experimentais **(b)**; ns: não significativo. * $p=0,0499$ versus grupo controle.

Figura 4 - Corte histológico do tecido adiposo subcutâneo



O número de adipócitos por campo é semelhante entre as duas amostras. Na imagem referente ao grupo controle **(a)** o número de adipócitos contados foi 91, enquanto na imagem referente ao grupo obesidade **(b)** o número de adipócitos foi 84. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento 10X.

Figura 5 - Corte histológico do tecido adiposo subcutâneo



A área dos adipócitos é maior na amostra da cadela obesa. As células em destaque nas imagens correspondem à maior célula de cada campo. No corte histológico da cadela do grupo controle **(a)**, o adipócito em destaque tem área de 15.800 μm^2 , enquanto no corte histológico da cadela do grupo obesidade **(b)** o adipócito em destaque tem área de 18.960 μm^2 . Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento 10X.

3.5. Macrófagos no tecido adiposo

Numericamente, o valor médio do número de macrófagos foi maior no grupo obeso em comparação ao grupo controle, mas sem diferença estatística. Os dados podem ser visualizados na Tabela 7 e na Figura 6.

Tabela 7 – Macrófagos M1 no tecido adiposo

Parâmetros	Grupo Controle (n=5)	Grupo Obeso (n=9)	p-valor
Nº macrófagos M1	2,4 ± 0,7	5,4 ± 1,6	0,2033

n: número de animais por grupo; \pm : erro padrão. Fonte: Própria autoria.

Figura 6 - Análise de macrófagos M1 no tecido adiposo

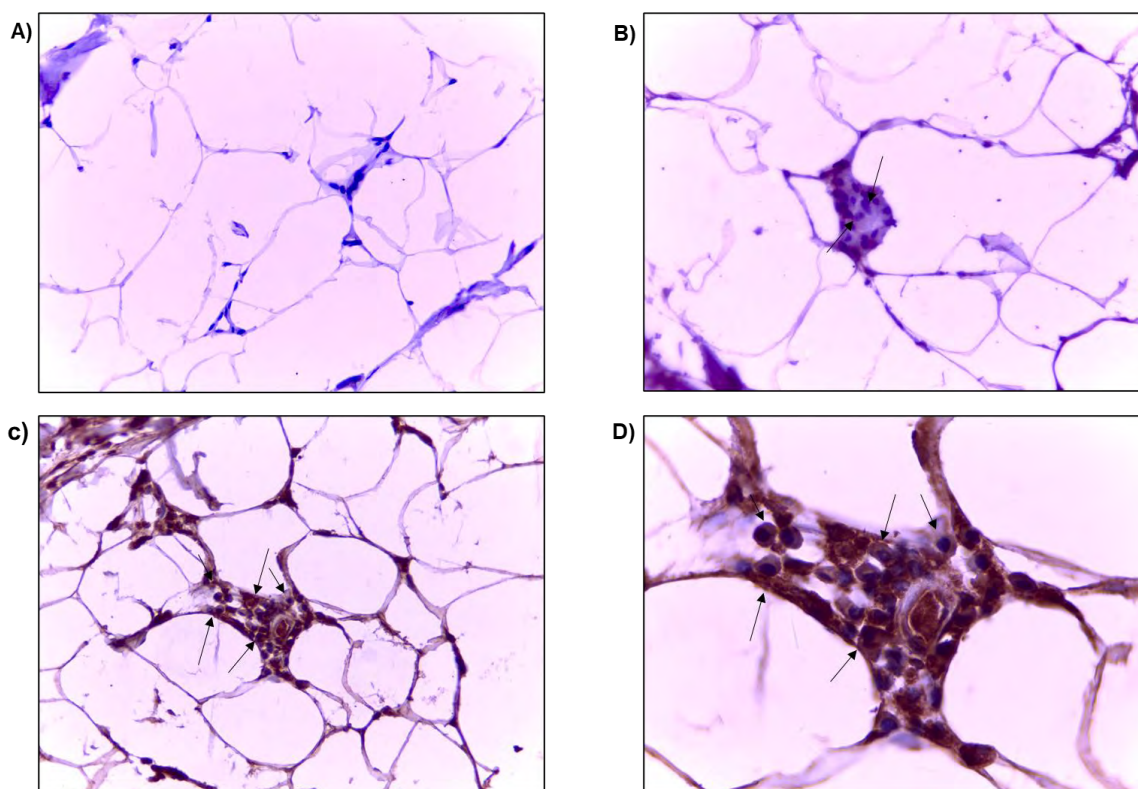
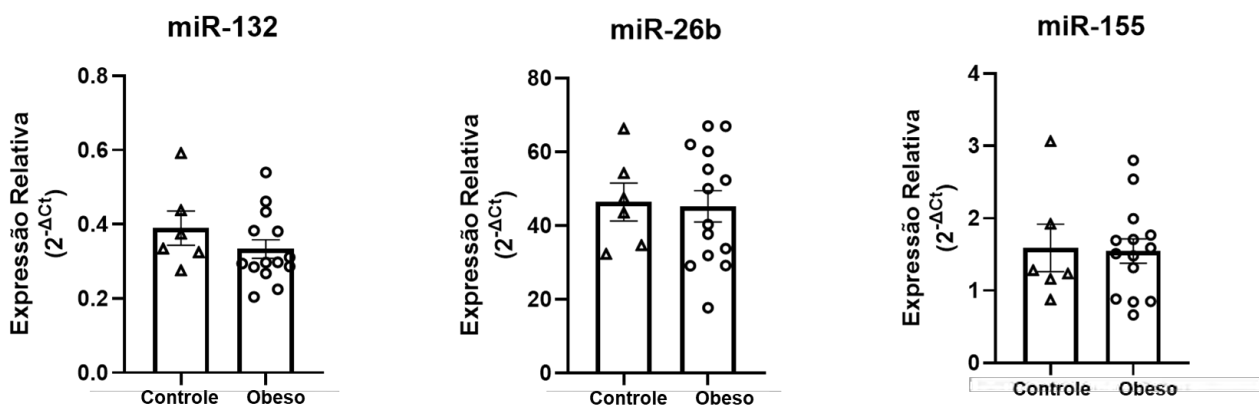


Figura 6. Amostra de tecido adiposo do grupo controle sem presença de macrófagos (A, 40x). Amostra de tecido adiposo grupo controle com presença de alguns macrófagos (B, 40x). Amostra de tecido adiposo grupo obeso com presença de macrófagos (C, 40x e D, 100x). As setas indicam os macrófagos M1.

3.6. miRNAs e genes alvo no tecido adiposo

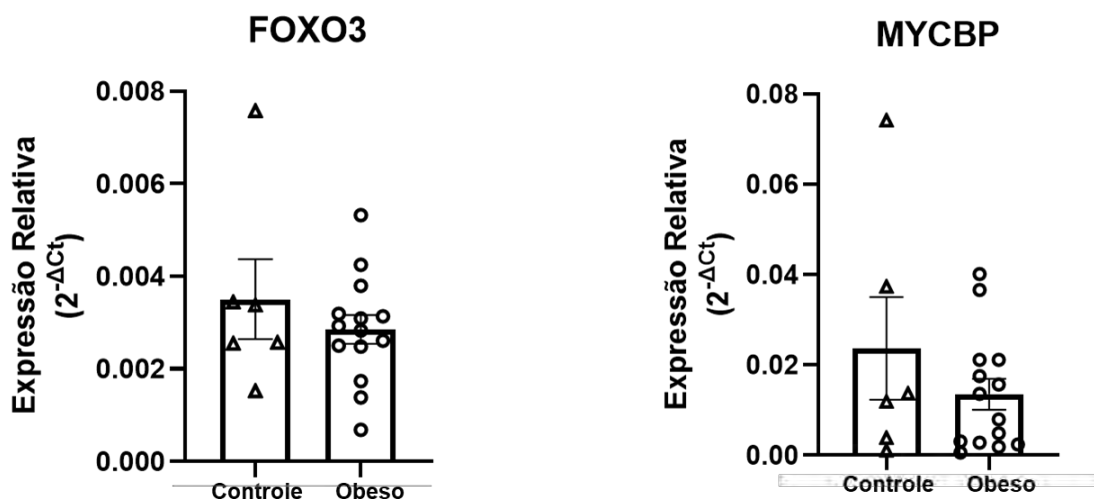
Os grupos não diferiram com relação a expressão dos miRNAs (Figura 7) e seus genes alvos (Figura 8). Em relação ao SOCS1, que seria o gene alvo do miR-155, não houve expressão no tecido adiposo e nos controles (linfonodo e célula de pele de cão).

Figura 7 - Expressão relativa dos miRNAs presentes no tecido adiposo



Os gráficos ilustram valores individuais e médios (\pm erro padrão) do miR-132, miR-26b e miR-155 respectivamente. Fonte: Própria autoria.

Figura 8 - Expressão relativa dos genes presentes no tecido adiposo



Os gráficos ilustram valores individuais e médios (\pm erro padrão) dos genes FOXO3 e MYCBP, respectivamente. Fonte: Própria autoria.

4. DISCUSSÃO

Nossa hipótese era que as cadelas obesas apresentassem maior infiltrado de macrófagos no tecido adiposo subcutâneo, associado a: 1) uma expressão diferencial (aumentada ou diminuída) dos miR-26b, miR-155 e miR-132 e seus respectivos genes alvo (MYCBP, SOCS1 e FOXO3) no tecido adiposo e 2) um padrão específico de VEs circulantes, que contivessem também os miR-26b, miR-155 e miR-132. E que a expressão dos miRNAs no tecido adiposo subcutâneo fossem a mesma nas VEs, no entanto isso não se confirmou.

As cadelas obesas não apresentaram diferença nos marcadores inflamatórios em comparação ao grupo controle. O tecido adiposo branco é aparentemente o sítio primário da inflamação associada à obesidade, devido a sua expansão e aumento da atividade secretora. Durante o remodelamento dinâmico ou expansão, o tecido adiposo branco sofre as consequências da hipoperfusão sanguínea e hipóxia, que resultam em uma inflamação local devido à ação das adipocinas inflamatórias e fatores quimiotáticos (GE et al., 2014; IZAOLA et al., 2015). A resposta inflamatória desencadeada pela obesidade também acarreta o aumento de adipocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda na circulação e, o recrutamento de leucócitos para tecidos inflamados (GE et al., 2014).

Os resultados dos marcadores inflamatórios avaliados sugerem que as cadelas obesas não apresentaram sinais de inflamação. Essas cadelas foram recrutadas com pelo menos um ano apresentando obesidade, é possível que os marcadores avaliados nesse estudo indicassem sinais de inflamação, caso as cadelas estivessem com obesidade severa há mais tempo ou, a análise de outros marcadores inflamatórios, como citocinas, poderia elucidar se as cadelas obesas apresentavam algum grau de inflamação. Entretanto, devido ao custo elevado do kit para análise de citocinas, tal análise não foi realizada. Um estudo avaliou que a concentração sérica de IL-6 foi maior em cães com sobrepeso e obesidade, em comparação a cães magros (FRANK et al., 2015; RAFAJ et al., 2016). A IL-6 é uma adipocina pró-inflamatória, que estimula o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e assim, a secreção de cortisol; a diferenciação dos linfócitos; a maturação de megacariócitos na medula óssea, aumentando a quantidade de plaquetas circulantes; e a síntese de proteína reativa C, fibrinogênio e amiloide sérico A pelo fígado.

O grupo obeso não diferiu do grupo controle com relação ao tamanho e concentração das VEs pequenas séricas. As VEs são produzidas em diferentes células e secretadas para o meio extracelular, atuando na comunicação célula a célula, uma vez que seu conteúdo tem elementos da célula de origem como, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (RNAm; miRNAs) (CAMINO et al., 2010). A presença de VEs pequenas foi confirmada pela expressão de proteínas específicas por western blotting e através da microscopia eletrônica de transmissão (de Ávila et al., 2020). Um estudo em mulheres obesas avaliou a associação da concentração de VEs circulantes com obesidade e, através da detecção de proteínas específicas, observaram que o

tecido adiposo estava liberando VEs, uma vez que o tecido se apresentava em expansão (KOBAYASHI et al., 2018). As cadelas obesas apresentaram bom estado geral, sem presença de doenças endócrinas como diabetes, hipotireoidismo e hiperadrenocorticismo, sem sinais de inflamação aparentes e com um perfil lipídico dentro dos valores de referência, e talvez por isso não apresentaram diferenças no tamanho e concentração das VEs circulantes.

Em um estudo complementar realizado pelo nosso grupo de pesquisa, cadelas castradas e obesas que apresentavam hipertrigliceridemia, apresentavam também aumento da concentração de VEs séricas. As cadelas obesas do presente estudo, não apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos e no perfil das VEs circulantes. Sendo assim, podemos sugerir que as alterações nas VEs séricas sejam associadas com as complicações da obesidade, como por exemplo a dislipidemia.

Com relação aos adipócitos, não houve diferença quanto ao número médio de adipócitos, porém houve diferença quanto a área média deles. Com o desenvolvimento da obesidade, o adipócito e o tecido adiposo como um todo passam por mudanças morfológicas e funcionais (PARLEE et al., 2014). O tecido adiposo expande através de uma combinação do aumento no tamanho dos adipócitos pré-existent (hipertrofia) e no número de adipócitos (hiperplasia). A hiperplasia, por sua vez, ocorre através do recrutamento e diferenciação de novos adipócitos, processo chamado de adipogênese.

Um estudo que monitorou a adipogênese do tecido adiposo branco de camundongos enquanto recebiam dieta rica em gordura e açúcar, demonstrou que os mesmos desenvolveram adipócitos hipertróficos no tecido adiposo subcutâneo dentro de 30 dias após o início do experimento, mantendo uma taxa de adipogênese muito baixa, mesmo após 2 meses do início da exposição à dieta (WANG et al. 2013). Um experimento com nove cadelas da raça Beagle foram separadas em dois grupos. O grupo que recebeu alimentação *ad libitum* teve maiores valores para peso corporal, gordura corporal e tamanho dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo, em relação ao grupo que recebeu alimento de forma controlada. Além disso, foram observadas mudanças associadas a homeostase mitocondrial e do retículo endoplasmático e alterações relacionadas a um estresse oxidativo no tecido adiposo subcutâneo das cadelas que receberam alimentação *ad libitum* (GRANT et al., 2011). Tais resultados se assimilam aos encontrados no presente estudo, no que diz respeito ao aumento na

área dos adipócitos observado nas cadelas obesas recrutadas, possivelmente devido a uma sobrealimentação. Essa condição também já foi descrita em seres humanos, em que o desbalanço energético crônico decorrente de uma sobrealimentação foi apontado como responsável por causar hipertrofia dos adipócitos, alterando a homeostase mitocondrial e do retículo endoplasmático (DE FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008), dando origem a um tecido adiposo disfuncional, caracterizado pela ativação de vias apoptóticas, inflamatórias e pela secreção de adipocinas pró-inflamatórias (MAURIZI et al., 2018). Ainda no âmbito humano, está bem retratado que a hipertrofia dos adipócitos pode contribuir para com o desenvolvimento de doenças metabólicas como o *diabetes mellitus*, hipertensão e dislipidemia (BAYS et al., 2008).

Outras doenças, estágios de desenvolvimento e condições fisiológicas podem levar ao remodelamento do tecido adiposo branco. As fêmeas desse estudo não apresentaram doenças ou comorbidades que possam ter causado interferência nos resultados, no entanto a constatação de um aumento na área dos adipócitos já representa uma importante modificação da homeostasia do tecido adiposo dessas cadelas, uma vez que o esperado, em um tecido saudável, seria um crescimento hiperplásico e não hipertrófico (HAMMARSTEDT et al., 2018). Portanto, sugere-se que o maior tamanho dos adipócitos observado no grupo das cadelas obesas tenha sido causado pelo acúmulo excessivo de gordura corporal.

Não foram observadas diferenças em relação aos marcadores de inflamação e o infiltrado de macrófagos M1 no tecido adiposo subcutâneo entre os grupos, no entanto o valor numérico de macrófagos M1 foi maior no grupo obeso. Em camundongos alimentados com dieta hipercalórica, Shimobayashi et al. (2018) observaram que após três semanas de dieta, houve um aumento da expressão da proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), no entanto o aumento do número de macrófagos no tecido adiposo branco foi observado apenas 10 a 16 semanas após o início da dieta. Dessa forma, podemos inferir que o aumento do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo ocorre de forma tardia e que possivelmente essas cadelas obesas apresentem alteração no infiltrado de macrófagos se continuarem obesas.

Estudos em humanos e animais de laboratório demonstraram que os miRNAs 155, 132 e 26b e seus respectivos genes alvo (SOCS1, FOXO3 e MYCBP) podem

regular o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo subcutâneo (ESSANDOH et al., 2016; KLOTING et al. 2009). Um estudo em humanos com tolerância normal a glicose e humanos com diabetes tipo 2, avaliou a expressão dos miR-155, miR-132 e miR-26b no tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo omental e observaram que os humanos com diabetes tipo 2 apresentavam aumento da expressão do miR-132 no tecido adiposo omental e aumento da expressão do miR-155 no tecido adiposo subcutâneo. A expressão do miR-132 no tecido adiposo omental e a expressão do miR-26b e miR-155 no tecido adiposo subcutâneo parecem desempenhar um papel na disfunção do tecido adiposo e no desenvolvimento de distúrbios associados à obesidade e, estarem relacionados com o número de infiltrados de macrófagos nesses tecidos (KLOTIN et al., 2009).

O miR-26b faz parte da família do miR-26, composta por miR-26a1, miR-26a2 e miR-26b (GHARANEI et al., 2020). Esses miRNAs em humanos, são considerados reguladores positivos da adipogênese precoce, sendo que a inibição desse miRNAs previne o acúmulo de lipídios. Acharya et al. (2019), observaram num estudo in vitro e in vivo, que o miR-26 tem participação significativa na regulação da adipogênese, sendo que a baixa expressão do miR-26 resultou na hiperplasia dos adipócitos e expansão do tecido adiposo branco.

Apesar desses resultados encontrados em humanos e animais laboratoriais, as cadelas obesas avaliadas nesse estudo não apresentaram alterações na expressão desses miRNAs e de seus genes alvos. No presente estudo, o não aumento do número de infiltrados de macrófagos no tecido adiposo, pode estar associado à não diferenciação da expressão dos miRNAs 155, 132 e 26b (nas VEs e no tecido adiposo subcutâneo) e dos genes FOXO3 e MYCBP (no tecido adiposo subcutâneo) entre os grupos. Além disso, o fator tempo de obesidade pode ter influência sobre a mudança na infiltração de macrófagos, assim como expressão de miRNAs.

Em conclusão, os resultados desse estudo demonstram que as cadelas obesas estão apresentando alteração em seus adipócitos, uma vez que a expansão hipertrófica do tecido adiposo demonstra uma alteração na homeostasia desse tecido. Possivelmente o processo inflamatório no tecido adiposo subcutâneo ainda não alterou vias inflamatórias locais e circulatórias, uma vez que não foi possível observar aumento do infiltrado de macrófagos M1 e alteração na expressão dos miRNAs avaliados.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A. *et al.* miR-26 suppresses adipocyte progenitor differentiation and fat production by targeting Fbxl19. **Genes & development**, v. 33, n. 19-20, p. 1367-1380, 2019.
- ARNER, P.; KULYTÉ, A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. **Nat Rev Endocrinol** v. 11, n. 5, p. 276, 2015.
- BAYS, H. E. *et al.* Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. **Expert Rev. Cardiovasc. Ther.**, v. 6, n. 3, p. 343-368, 2008.
- BERRY, R. *et al.* Imaging of adipose tissue. **Meth. Enzymol.**, v. 537, p. 47-73, 2014.
- BROWN, S. *et al.* Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **J Vet Intern Med**, v. 21, n. 3, p. 542-558, 2007.
- BYEON, H. E. *et al.* MicroRNA-132 Negatively Regulates Palmitate-Induced NLRP3 Inflammasome Activation through FOXO3 Down-Regulation in THP-1 Cells. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1370, 2017.
- CAMILLO, C. S. *et al.* Caderno de histologia: texto e atlas. 2017. Disponível em: <<http://repositorio.ufrn.br>> Acesso em: 25 out. 2018.
- CAMINO, T. *et al.* Deciphering adipose tissue extracellular vesicles protein cargo and its role in obesity. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 24, p. 9366, 2020.
- CINTI, S. *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**, v. 46, n. 11, p. 2347-2355, 2005.
- CHALUS, T. *et al.* Ultrasonographic adrenal gland measurements in healthy Yorkshire Terriers and Labrador Retrievers. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.42, n.1, p. 57-64, 2013.
- DE ÁVILA, A. C. F. C. M. *et al.* Estrous cycle impacts microRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during in vitro maturation. **Biol. Reprod.**, v.102, n.2, p. 362-375, 2020.
- DE FERRANTI, S.; MOZAFFARIAN, D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. **Clin Chem**, v. 54, n. 6, p. 945-955, 2008.
- DA SILVEIRA, J. C. *et al.* Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179451, 2017.

D'ANJOU, M. A.; PENNINGCK, D. Adrenal Glands. In: PENNINGCK, D.; D'ANJOU, M.A. **Atlas of small animal ultrasonography**. 2nd ed. John Wiley & Sons, 2015. p.387-401.

EIKELIS, N. *et al.* MicroRNA-132 may be associated with blood pressure and liver steatosis—preliminary observations in obese individuals. **J. Hum. Hypertens.**, p. 1-6, 2021.

ESSANDOH, K. *et al.* MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 46, n. 2, p. 122, 2016.

FEITOSA, F. L.F. Exame físico geral ou de rotina. *Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico*. São Paulo: Roca, 2004, cap, 4, 77-102.

FRANK, L. *et al.* Increasing body condition score is positively associated interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 in Labrador retrievers. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 167, n. 3-4, p. 104-109, 2015.

GE, Q. *et al.* microRNAs as a new mechanism regulating adipose tissue inflammation in obesity and as a novel therapeutic strategy in the metabolic syndrome. **J Immunol Res**, v. 2014, 2014.

GONELLA-DIAZA, A. M. *et al.* Steroidal regulation of oviductal microRNAs Is associated with microRNA-processing in beef cows. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22, n. 2, p. 953, 2021.

GHARANEI, S. *et al.* Regulatory microRNAs in brown, brite and white adipose tissue. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2489, 2020.

HAMMARSTEDT, A. *et al.* Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity. **Physiol Rev**, v. 98, n. 4, p. 1911-1941, 2018.

IZAOLA, O. *et al.* Inflamación y obesidad (lipoinflamación). **Nutr Hosp**, v. 31, n. 6, p. 2352-2358, 2015.

KIM, A.; SHAH, A. S.; NAKAMURA, T. Extracellular vesicles: a potential novel regulator of obesity and its associated complications. **Children**, v. 5, n. 11, p. 152, 2018.

KOBAYASHI, Y. *et al.* Circulating extracellular vesicles are associated with lipid and insulin metabolism. **Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.**, v. 315, n. 4, p. E574-E582, 2018.

KLÖTING, N. *et al.* MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. e4699, 2009.

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

LÄSSER, C.; ELDH, M.; LÖTVALL, J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 59, p. e3037, 2012.

LI, H. *et al.* Transcriptional regulation of macrophages polarization by MicroRNAs. **Front Immunol**, v. 9, 2018.

MACEDO, H. T. *et al.* Weight-loss in obese dogs promotes important shifts in fecal microbiota profile to the extent of resembling microbiota of lean dogs. **Animal Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2022.

MAURIZI, G. *et al.* Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation. **J. Cell. Physiol.**, v. 233, n. 1, p. 88-97, 2018

MULDER, N. L. *et al.* AAV8-mediated gene transfer of microRNA-132 improves beta cell function in mice fed a high-fat diet. **J. Endocrinol.**, v. 240, n. 2, p. 123-132,

2019. NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. **Small animal diagnostic ultrasound**. Elsevier health sciences, 2002.

PARLEE, S. D. *et al.* Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. **Meth. Enzymol.**, v. 537, p. 93-122, 2014.

RADAKOVICH, L. B. *et al.* Clinically healthy overweight and obese dogs differ from lean controls in select CBC and serum biochemistry values. **Vet Clin Pathol**, v. 46, n. 2, p. 221-226, 2017.

RAFAJ, R. B. *et al.* Plasma markers of inflammation and hemostatic and endothelial activity in naturally overweight and obese dogs. **BMC Vet Res**, v. 13, n. 1, p. 13, 2016.

RAFFAN, E. A Comprehensive Review of the Role of Genetics in Obesity in Dogs and Other Species. 2022.

SOULSBY, S. N. *et al.* Ultrasonographic evaluation of adrenal gland size compared to body weight in normal dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.56, n.3, p.317-326, 2015.

SCARPELLINI, E.; TACK, J. Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition. **Dig Dis**, v. 30, n. 2, p. 148-153, 2012.

SCHULTZ, R. M. *et al.* Contrast-enhanced computed tomography as a preoperative indicator of vascular invasion from adrenal masses in dogs. **Vet Radiol Ultrasound**, v.50, n.6, p. 625-629, 2009.

SHIMOBAYASHI, M. *et al.* Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 4, p. 1538-1550, 2018.

THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e bioquímica veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2006. 582p.

TROPF, M. *et al.* Cardiac and Metabolic Variables in Obese Dogs. **J Vet Intern Med**, v. 31, n. 4, p. 1000-1007, 2017.

URIBE, J. H. *et al.* Physical training and weight loss in dogs lead to transcriptional changes in genes involved in the glucose-transport pathway in muscle and adipose tissues. **Vet J**, v. 208, p. 22-27, 2016.

XU, J. *et al.* Secreted phospholipase A2 inhibitor modulates fatty acid composition and reduces obesity-induced inflammation in Beagle dogs. **Vet J**, v. 204, n. 2, p. 214-219, 2015.

WANG, Q. A. *et al.* Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nat. Med.**, v. 19, n. 10, p. 1338-1344, 2013.

ZHUANG, G. *et al.* A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity associated adipose tissue inflammation. **Circulation**, p. CIRCULATIONAHA.111.087817, 2012.

**ANEXO A - DESCRIÇÃO DOS VALORES DO TESTE T4 LIVRE POR DIÁLISE
(CAPÍTULO 4)**

Grupo Obesidade (n=21)	
Cadelas	T4 livre (ng/dL)
1	1,43
2	3,95
3	1,67
4	1,23
5	2,31
6	2,48
7	3,52
8	1,71
9	2,28
10	1,30
11	1,33
12	1,25
13	2,21
14	2,37
15	0,92
16	1,44
17	1,34
18	1,76
19	1,01
20	1,28
21	2,20

Valor de Referência 0,82 - 3,65

O teste foi realizado no centro veterinário diagnóstico PROVET, na cidade de São Paulo.