



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAMILE HADDAD NETA

**EFEITOS DA REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA NA
ADIPOSIDADE E NA MICROBIOTA FECAL DE GATAS
PREVIAMENTE CASTRADAS**

Londrina
2020

JAMILE HADDAD NETA

**EFEITOS DA REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA NA
ADIPOSIDADE E NA MICROBIOTA FECAL DE GATAS
PREVIAMENTE CASTRADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins

Londrina
2020

- J32 Haddad Neta, Jamile.
EFEITOS DA REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA NA ADIPOSIDADE E NA MICROBIOTA FECAL DE GATAS PREVIAMENTE CASTRADAS / Jamile Haddad Neta. - Londrina, 2020.
96 f. : il.
- Orientador: Maria Isabel Mello Martins.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.
Inclui bibliografia.
1. obesidade felina - Tese. 2. castração - Tese. 3. reposição estrogênica - Tese. 4. microbiota fecal - Tese. I. Mello Martins, Maria Isabel . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.
- CDU 619

JAMILE HADDAD NETA

**EFEITOS DA REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA NA
ADIPOSIDADE E NA MICROBIOTA FECAL DE GATAS
PREVIAMENTE CASTRADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a. Maria Denise Lopes
Universidade Estadual de São Paulo - UNESP

Prof. Dr^a. Ana Augusta Pagnano Derrussi
Universidade José do Rosário Vellano -
UNIFENAS

Prof. Dr. Fábio Nelson Gava
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Karina Keller M. C. Flaiban
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela constante inspiração aos ajustes de crescimento, oferecendo novas folhas para a escrita de novos recomeços na espiral da vida.

Aos meus pais, Hanna Salloum Haddad (*in memoriam*) e Lorice Massabki Haddad, que nunca mediram esforços para meu progresso pessoal e profissional. Aos meus filhos, Camila Girdali e Rafael Haddad Girdali, por existirem e me apoiarem sempre. Obrigada por tanto amor!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins, por sua atitude sempre acolhedora, simples, humana, positiva e corajosa, por seu incentivo, confiança e clareza mental capaz de desobstruir e simplificar os raciocínios mais tortuosos.

À toda equipe que ajudou a transformar este sonho em realidade, em especial Luiz Guilherme Corsi Trautwein, Anne Kemmer de Souza Candotti, Ana Beatriz Marques de Almeida, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo, Guilherme Schiess Cardoso, Luana Martins de Souza e Natália Ribeiro da Silva.

Ao José Antônio Bessegatto, pela amizade genuína e por suas valiosas sugestões e contribuições para enriquecer o nível científico deste trabalho.

À Fabiana Doring e Luiz César Piccelli, pela inestimável ajuda na obtenção dos animais, e à Camila Bortoliero, que contribuiu para que fossem todos tão bem adotados.

Ao Laboratório de Reprodução Animal e toda sua equipe pelo apoio e amizade: Prof. Dr. Marcelo Seneda, Larissa Bergamo, Camila Bizarro, Camila Rosa, Nathália Covre, Tamires Korchovei Sanches, Denis Vinícius Bonato, Amanda Fonseca Zangirolamo, Marcela Cerezetti, Eduardo Rosignolo, Ana Clara Canto Souza, Andressa Lindquist e todos os estagiários.

Ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, pela atenção e prontidão por parte de funcionários, residentes e estagiários. Em especial aos funcionários José Roberto Campos de Magalhães e Inês de Fátima Germano.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas e seu qualificado corpo docente, de onde surgiu a inspiração para este projeto. Em especial ao Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa, pelo apoio intelectual em várias fases deste

estudo e suas considerações oportunas na banca de qualificação, e Prof^{as}. Maria Fernanda Rodrigues Graciano, Thais Bussamra Vieira Zaia e Sílvia Ponzoni, pela postura sempre aberta quanto à doação e troca de experiências.

Ao Laboratório de Histologia do Centro de Ciências Biológicas, representado pelo Prof. Dr. Fábio Goulart, que acolheu gentilmente a proposta de parceria e disponibilizou todos os recursos necessários para realização da histotécnica adiposa.

À Prof^a. Dr^a. Sandra Simonelli, por sua contribuição para sanar as dúvidas sobre estatística, com paciência, dedicação e generosidade ímpar.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Hospital Veterinário, pelo estímulo intelectual; ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e todo seu corpo docente, pelo conceito de qualidade obtido com a seriedade e excelência de seu propósito.

À CAPES, pela concessão da bolsa, possibilitando a dedicação exclusiva e necessária para a conclusão dessa importante etapa de vida.

À TotalVet pela disponibilização e pela qualidade dos insumos necessários para a realização de grande parte do experimento e a manutenção dos animais a longo prazo.

E por fim, às doces criaturas que fizeram parte deste experimento e que, apesar do histórico prévio de abandono, souberam conviver entre si de forma harmoniosa, contribuindo para que este estudo fosse conduzido com entusiasmo e paixão.

HADDAD NETA, Jamile. **Efeitos da reposição estrogênica na adiposidade e na microbiota fecal de gatas previamente castradas.** 2020. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A castração felina é fator de risco para obesidade e *diabetes mellitus*. O tratamento da obesidade é desafiador e busca por estratégias inovadoras, como a restauração dos efeitos hipofágicos do estrógeno por meio de sua reposição e a manipulação da microbiota de perfil magro. Este trabalho avaliou os efeitos do valerato de 17 β -estradiol sobre o consumo alimentar, ganho de peso, perfil bioquímico, morfometria adipocitária e microbiota em 12 gatas divididas em três grupos: OH+E₂ (gatas ovariectomizadas com reposição estrogênica), OH (gatas ovariectomizadas sem reposição estrogênica) e SHAM (gatas submetidas apenas à celiotomia). Utilizou-se a dose de 4 μ g durante três meses (E1), e após um intervalo de 20 dias a dose foi aumentada para 12 μ g durante três meses (E2). O registro do consumo alimentar e do peso foi diário e semanal, respectivamente. Amostras de sangue para exames bioquímicos e esfregaço vaginal para colpocitologia foram obtidos a cada seis semanas, sob sedação, e amostras de tecido adiposo subcutâneo foram colhidas sob anestesia no momento anterior ao experimento e ao final de E1 e E2. Amostras de fezes foram colhidas no último dia do experimento, armazenadas a -80°C e submetidas ao sequenciamento das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. A reposição com 4 μ g não exerceu os efeitos hipofágicos e de perda de peso, enquanto a reposição com 12 μ g resultou em perda de peso ($p=0,03$), hipofagia nas primeiras quatro semanas e presença de células superficiais na colpocitologia. As dosagens bioquímicas apresentaram-se dentro dos valores de referência, com aumento de triglicérides ($p=0,004$) e ALT no grupo OH, enquanto a reposição com 12 μ g mantiveram-nas em declínio. Houve aumento da área dos adipócitos em todos os grupos, sendo significativo no grupo OH ($p=0,026$). A hipertrofia adipocitária foi mais discreta no grupo com reposição. Não houve diferença quanto à alfa diversidade da microbiota fecal entre os grupos, enquanto a beta diversidade mostrou uma diferença entre a estrutura das comunidades nos grupos. A relação Firmicutes/Bacteroidetes foi maior nos grupos OH e OH+E₂ em comparação com SHAM, impulsionada pela maior abundância de *Megasphaera*, *Megamonas* e *Dialister* ($p=0,020$) no grupo OH+E₂, em comparação com SHAM. Como conclusão, a reposição de 17 β -estradiol na dose de 12 μ g promoveu um maior controle da adiposidade associado à presença de células superficiais na colpocitologia e diferença na beta diversidade da microbiota fecal.

Palavras-chave: Felinos. Castração. Obesidade. Estradiol. Microbiota fecal.

HADDAD NETA, Jamile. **Effects of estrogen replacement on adiposity and fecal microbiota of previously castrated cats.** 2020. 96pp. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Feline castration is a risk factor for obesity and diabetes mellitus. The treatment of obesity is challenging and seeks innovative strategies, such as the restoration of the hypophagic effects of estrogen through its replacement and the manipulation of the thin profile microbiota. This work evaluated the effects of 17 β -estradiol valerate on food consumption, weight gain, biochemical profile, adipocyte and microbiota morphometry in 12 cats divided into three groups: OH + E2 (ovariohysterectomized cats with estrogen replacement), OH (cats ovariohysterectomized without estrogen replacement) and SHAM (cats submitted to celiotomy only). The dose of 4 μ g was used for three months (E1), and after an interval of 20 days the dose was increased to 12 μ g for three months (E2). Food consumption and weight were recorded daily and weekly, respectively. Blood samples for biochemical examinations and vaginal smear for colpocytology were obtained every six weeks, under sedation, and samples of subcutaneous adipose tissue were collected under anesthesia before the experiment and at the end of E1 and E2. Stool samples were collected on the last day of the experiment, stored at -80°C and subjected to the sequencing of the V3 / V4 regions of the 16S rRNA gene. The replacement with 4 μ g did not have the hypophagic and weight loss effects, while the replacement with 12 μ g resulted in weight loss ($P = 0.03$), hypophagia in the first four weeks and the presence of superficial cells in the colpocytology. Biochemical measurements were within the reference values, with an increase in triglycerides ($P = 0.004$) and ALT in the OH group, while replacement with 12 μ g kept them in decline. There was an increase in the area of adipocytes in all groups, being significant in the OH group ($P = 0.026$). Adipocyte hypertrophy was more discreet in the replacement group. There was no difference regarding the alpha diversity of the fecal microbiota between the groups, while the beta diversity showed a difference between the structure of the communities in the groups. The Firmicutes / Bacteroidetes ratio was higher in the OH and OH + E2 groups compared to SHAM, driven by the greater abundance of *Megasphaera*, *Megamonas* and *Dialister* ($P = 0.020$) in the OH + E2 group, compared to SHAM. In conclusion, the replacement of 17 β -estradiol at a dose of 12 μ g promoted a greater control of adiposity associated with the presence of superficial cells in colpocytology and difference in the beta diversity of the fecal microbiota.

Keywords: Feline. Castration. Obesity. Estradiol. Fecal microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 – Representação esquemática da distribuição do tecido adiposo branco em mamíferos 25

Artigo A – Influence of estrogen replacement on adiposity and biochemical profile of ovariectomized cats

Figura 1 – Illustration of the experimental design containing the timeline (in days) of the experimental protocol..... 71

Figura 2 – Weight gain (kg) (A) and food intake (g) (B) of the cats in groups (T and C) in E1, using the 4 µg dose of 17 β-estradiol and in E2, using the 12 µg dose of 17 β-estradiol.. 72

Figura 3 – Linear pattern of the food intake behavior (g) of the cats in groups T and C in E1 (A), using the dose of 4 µg, of 17 β-estradiol and in E2 (B), using the 12 µg dose of 17 β-estradiol 73

Figura 4 – Serum estrogen concentration (pg/mL) of the cats in the groups (T and C) before the experiment (M0), in E1 using the dose of 4 µg of 17 β-estradiol and in E2 using the dose of 12 µg of 17 β-estradiol..... 74

Figura 5 – Adipocyte area in different groups and times. 75

Artigo B – Influence of estrogen replacement on the fecal microbiota of ovariectomized cats

Figura 1 – Principal component analysis chart (PCoA) representing the fecal microbial communities of cats in the OH+E₂, OH and SHAM groups in terms of composition (Jaccard), in A, and structure (Yue & Clayton), in B 90

Figura 2 – Dendrogram representing the distance between faecal samples from cats receiving estrogenic replacement (OH+E₂) and control cats (SHAM). 91

Figura 3 – General percentage distribution of the bacterial population, at

phylum level, present in the feces of three groups of cats
(OH+E₂, OH and SHAM). 92

Figura 4 – General percentage values of bacterial populations present in
feces, at the gender level, in three groups of cats (OH+E₂, OH
and SHAM). 93

LISTA DE TABELAS

Artigo A – Influence of estrogen replacement on adiposity and biochemical profile of ovariectomized cats

- Tabela 1** – Body weight (BW) (kg) and body condition score (ECC) of the cats in groups (T and C), on days zero, 30, 165 (at the end of E1) and 275 (at the end of E2), with the final weight gain (WG) (in kg and%). 66
- Tabela 2** – Hematological values of red blood cells ($\times 10^6 / \mu\text{L}$), hemoglobin (g / dL), hematocrit (%), leukocytes ($\times 10^3 / \mu\text{L}$), platelets ($\times 10^3 / \mu\text{L}$) and RDW (%), (with their respective values of reference), in the groups (T and C) before (M0) and during estrogen replacement with 17β -estradiol at the dose of $4\mu\text{g}$ (E1) and $12\mu\text{g}$ (E2). 67
- Tabela 3** – Serum values of alkaline phosphatase (AP), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyltransferase (GGT), urea, creatinine, proteins, glucose, triglycerides and cholesterol, with their respective reference values, in the different groups before (M0) and during estrogen replacement with 17β -estradiol at a dose of $4\mu\text{g}$ (E1) and $12\mu\text{g}$ (E2) 68
- Tabela 4** – Predominant cell type in the vaginal cytology of the cats in the different groups (T and C) and moments (days 0, 165 and 275) 70

Artigo B – Influence of estrogen replacement on the fecal microbiota of ovariectomized cats

- Tabela 1** – Values of food intake (FI) (g) and weight gain (WG) (kg) of the cats (in kg) in the groups (OH+E₂, OH and SHAM), in the period prior to the experiment (M0) and using doses of $4\mu\text{g}$ and $12\mu\text{g}$ 87
- Tabela 2** – Serum estrogen values (pg/mL), by the radioimmunoassay technique, of the cats in the groups (OH+E₂, OH and SHAM) before the experiment and receiving estrogen replacement with 17β -estradiol at a dose of $4\mu\text{g}$ (E1) and $12\mu\text{g}$ (E2) 88

Tabela 3 – Classification and species richness of the fecal microbiota in three groups of cats (OH+E₂, OH and SHAM), expressed as a percentage, at the phylum level..... 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGRP	Peptídeo relacionado à cepa AGOUTI
AHL	Área hipotalâmica lateral
ALT	Alanina aminotransferase
AMOVA	Análise de variância molecular
ANOVA	Análise de variância
ARC	Núcleo Arqueado
CART	Fator de transcrição cocaína-anfetamina
CCK	Colecistocinina
CRF	Fator liberador de corticotropina
DMT2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
E1	Experimento 1
E2	Experimento 2
E ₂	Estrógeno
ECC	Escore de condição corporal
ER	<i>Estrogen receptor</i>
EST	Enzima estrogênio sulfotransferase
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamiltransferase
HVM	Hipotálamo ventromedial

IGF-1	<i>Insuline-like Growth Factor - 1</i>
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
LPS	Lipopolissacarídeos
NPV	Núcleo Paraventricular
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OH	Ovariohisterectomia
PAI	<i>Platelet activator inhibitor</i>
POMC	Pró-opiomelanocorticotropina
SHAM	Cirurgia placebo ou fictícia
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAG	Triacilglicerídeos
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TAMe	Tecido Adiposo Medular
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
UCP-1	<i>Uncoupling protein-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	OBESIDADE HUMANA	18
2.2	OBESIDADE FELINA	21
2.3	O TECIDO ADIPOSEO E SEU PAPEL NA OBESIDADE	23
2.2.1	Origem e Composição Geral do Tecido Adiposo	24
2.2.2	Anatomia e Distribuição do Tecido Adiposo	25
2.2.3	Vascularização e Inervação do Tecido Adiposo	26
2.2.4	Adipogênese e Desenvolvimento dos Tipos de Tecidos Adiposos	26
2.2.5	Moléculas Bioativas do Tecido Adiposo	31
2.3	O ESTRÓGENO E SUA PARTICIPAÇÃO NO MECANISMO DA OBESIDADE	32
2.4	A MICROBIOTA E SUA RELAÇÃO COM A OBESIDADE	35
3	REFERÊNCIAS	39
4	HIPÓTESES	48
5.	OBJETIVOS	49
5.1	OBJETIVO GERAL	49
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
6	ARTIGO A – INFLUÊNCIA DA REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA NA ADIPOSIDADE E PERFIL BIOQUÍMICO DE GATAS OVARIOHISTERECTOMIZADAS.	50
	ARTIGO B – INFLUÊNCIA DA REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA NA MICROBIOTA DE GATAS OVARIOHISTERECTOMIZADAS	77
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	94
	ANEXOS	95

ANEXO A – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais para a realização do experimento	95
ANEXO B – Resultado da Sorologia para Pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> nos animais que fizeram parte do experimento	96

1 INTRODUÇÃO

A obesidade, desordem nutricional mais comum em gatos domésticos (TARKOSOVA et al., 2016), é definida como uma doença epidêmica (ROWE et al., 2015), crônica e multifatorial complexa (CORBEE, 2014), de difícil controle, decorrente do balanço energético positivo que favorece o acúmulo de tecido adiposo. Não há estudos nacionais sobre a prevalência da obesidade felina. Porém, pesquisas apontam que a mesma se situa entre 25 e 57% nos países em desenvolvimento (LINDER; MUELLER, 2014), e sua tendência mostra-se crescente apesar dos esforços substanciais de controle, tanto em humanos quanto em animais (LARSEN; VILLAVERDE, 2016). Dos fatores de risco envolvidos, muitos permanecem controversos (TENG et al., 2017) e podem estar relacionados ao animal, ao proprietário e/ou ao manejo ((WALL; CAVE; VALLEE, 2019).

No âmbito da Saúde Única, o aumento crescente da obesidade reflete o compartilhamento epidêmico relacionado a estilos de vida e ambiente doméstico em comum entre seres humanos e animais (DAY, 2010). A renda familiar, hábitos de exercício, idade do proprietário e natureza do vínculo entre homem-animal são fatores exógenos associados positivamente ao aumento do risco de sobrepeso ou obesidade (COUCIER et al., 2010; KIENZLE; BERGLER, 2006). Considera-se a obesidade em *pets* um modelo biológico para a obesidade infantil (GERMAN, 2015): da mesma forma que os pais de crianças, “*pet*-pais” dão comida extra aos seus animais para obter afeto e interação positiva, o que pode resultar em vício alimentar através de uma relação de co-dependência, e como consequência, a obesidade (HAWN, 2006).

Dos fatores endógenos, a castração representa um importante risco para a obesidade, especialmente em machos (SLINGERLAND et al., 2009). Deste modo, apesar de ser uma estratégia efetiva no controle da superpopulação felina (COOKE; NAAZ, 2004), a orquiectomia pode levar ao aumento, em média, de 25-30% de peso corpóreo, a maioria por acréscimo de tecido adiposo corporal (BACKUS, 2011). Recomenda-se que os esforços preventivos da obesidade sejam focados no primeiro ano de vida, e uma vez exacerbada pela castração, enfatiza-se que o papel do Médico Veterinário seja essencial neste período crítico com relação à educação do proprietário (WALL; CAVE; VALLEE, 2019).

As ações anti-obesidade dos estrógenos são bem documentadas, e sua ausência, seja pela menopausa ou castração, leva a alterações hormonais e

reduções da taxa metabólica que culminam com o aumento do peso corporal e ao acúmulo de tecido adiposo (JEUSETTE et al., 2004), enquanto que a reposição com doses fisiológicas deste hormônio diminui a ingestão alimentar e o peso corpóreo (ASARIAN; GEARY, 2002; ROESCH, 2006; ROGERS et al., 2009).

Muitas evidências indicam que os efeitos do estrógeno na ingestão de alimentos, em mulheres e roedores, são mediados por suas ações centrais e periféricas. As centrais ocorrem pelas interações em receptores nos centros neurobiológicos envolvidos no controle do apetite, encontrados no hipotálamo ventromedial (HVM), núcleo paraventricular (PVN) e romboencéfalo, na região caudal do núcleo do trato solitário (NTS) (THAMMACHAROEN et al., 2008). As ações periféricas ocorrem pela interação do estrógeno com os sistemas peptidérgicos da ingestão de alimentos como colecistocinina (CCK), neuropeptídeo Y (NPY) e grelina.

Em ratas intactas e ovariectomizadas, observou-se que estrógeno amplifica os sinais de saciedade que surgem no decurso da refeição, através de suas interações com a CCK, um peptídeo hormonal liberado no intestino delgado durante as refeições que age em receptores CCK₁ no intestino, e cuja estimulação ativa fibras aferentes do nervo vago. Tais fibras estimulam estruturas neurais encefálicas (NTS, PVN) e resultam na cessação da ingestão de alimentos, que ocorre primariamente pela diminuição do tamanho da refeição (BUTERA, 2010). O estrógeno também age atenuando os efeitos orexígenos da grelina e do NPY. A grelina é um peptídeo produzido no estômago, e suas concentrações encontram-se aumentadas durante o jejum e diminuídas após a refeição. Sua administração estimula a fome em animais e humanos, mostrando tratar-se de um hormônio orexígeno. Ratos machos e fêmeas ovariectomizadas são mais sensíveis aos efeitos da grelina administrada via central ou periférica do que fêmeas intactas ou ovariectomizadas com reposição estrogênica (CLEGG et al., 2007).

O efeito do estrógeno no comportamento alimentar pode envolver uma atenuação dos sinais orexígenos, possivelmente pela modulação dos efeitos dos sinais periféricos da grelina nos neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos no controle da ingestão alimentar (por exemplo, o NPY). Consistente com esta hipótese, o estrógeno mostrou atenuar os efeitos orexígenos de infusões intracerebroventriculares de NPY e a liberação de NPY no PVN de ratas ovariectomizadas (BONAVERA et al., 1994). De acordo com Silva et al. (2010), o tratamento com estrógeno em ratas ovariectomizadas induziu um menor consumo

alimentar, menor ganho de peso e concentrações plasmáticas de leptina, tanto antes quanto após a alimentação. Além disso, o estrógeno pode modificar a expressão de RNAm para vários neuropeptídeos hipotalâmicos e receptores localizados no núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN) e área hipotalâmica lateral (AHL).

Na espécie felina, foi demonstrado que a administração diária e a curto prazo de baixas doses de estrógeno (0,5 a 4 µg por animal) em animais castrados e obesos, tanto machos como fêmeas, reduziu significativamente a ingestão alimentar (BACKUS, 2011; CAVE et al., 2007; WARA et al., 2015).

Além da reposição estrogênica, há também evidências de que a microbiota intestinal desempenha um importante papel na obesidade, influenciando a homeostase energética do organismo, além de afetar o sistema imune, a resposta inflamatória (QIN; LI; CAI, 2012), a extração de energia da dieta (KALLUS; BRANDT, 2012) e a alteração da produção de hormônios da saciedade do hospedeiro (FLINT, 2011). Dessa forma, há um crescente interesse na compreensão do papel da microbiota intestinal para elucidar o potencial terapêutico de sua manipulação (PENTEADO; SALGADO; BARLEM, 2017).

Estudos caracterizando a microbiota fecal de felinos já foram realizados (DEUSCH et al, 2015; RITCHIE et al., 2010) bem como comparação da microbiota entre gatos magros, obesos e castrados (FISCHER et al., 2017). Não há, porém, ao conhecimento dos autores, estudos da microbiota em gatas castradas recebendo reposição estrogênica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o consumo alimentar, o ganho de peso, a bioquímica sérica, a histologia do tecido adiposo e a microbiota fecal em gatas castradas recebendo, por longo prazo, reposição de 17 β-estradiol, a fim de determinar sua validade como estratégia de prevenção da obesidade pós castração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OBESIDADE HUMANA

A obesidade é definida como uma doença pandêmica, crônica e multifatorial complexa, de difícil controle, decorrente do balanço energético positivo que favorece o acúmulo de tecido adiposo, obtendo destaque na agenda pública internacional pelo seu aumento em proporções globais e alarmantes nas três últimas décadas (TURCONI; CENA, 2013; WHO, 2018). Dados da OMS apontam que a obesidade mundial quase triplicou desde 1975. Em 2016 a prevalência de adultos apresentando excesso de peso foi de 1,9 bilhão (39%), sendo 650 milhões (13%) obesos. Com relação às crianças menores de cinco anos, 41 milhões estavam acima do peso ou obesas. Na faixa etária entre cinco e 19 anos, a proporção atingiu 340 milhões. Sua crescente prevalência envolve componentes ambientais (político, econômico, social, cultural), genéticos, fisiológicos, metabólicos, comportamentais e psicológicos, e não apenas o indivíduo e suas escolhas, exigindo uma análise estratégica do problema e nas propostas de intervenções.

Contudo, o desafio reside em compreender como esses múltiplos fatores interagem (DIAS et al., 2017). Globalmente, há mais pessoas obesas do que abaixo do peso, exceto partes da África subsariana e da Ásia (WHO, 2018). Para o diretor geral da FAO, José Graziano da Silva: “Enquanto a fome se limita principalmente às áreas afetadas por conflitos ou que sofrem os efeitos das mudanças climáticas, a obesidade está em todas as partes: estamos presenciando sua globalização” (FAO, 2019). Embora a desnutrição e a obesidade sejam dois extremos de um mesmo problema nutricional, compartilhando altos níveis de invalidez, baixa expectativa de vida e produtividade, os maiores índices de morbidade e mortalidade estão associados à obesidade, uma vez que esta aumenta o risco de comorbidades como doenças cardiovasculares, doenças asmáticas, apnéia do sono, osteoartrite, infertilidade, diabetes, hipertensão, vários tipos de câncer, diminuição da expectativa de vida em torno de 10 anos (BAUER et al., 2014; TURCONI; CENA, 2013), além de problemas sociais e psicológicos como depressão, baixa estima, estigmatização e suicídio (PEDERSEN; SJODIN; ASTRUP, 2012).

A compreensão do impacto da obesidade na atualidade depende de uma análise da história humana sendo caracterizada por uma série de transições.

A transição demográfica é caracterizada pelo desvio de padrão de alta fertilidade e mortalidade (típica de países menos desenvolvidos décadas atrás e da Europa do século XVIII), para um de baixa fertilidade e mortalidade (típico das nações modernas industrializadas). Este conceito foi originalmente proposto em 1929 por Warren Thompson (1887-1973), para contestar matematicamente a Teoria Demográfica Malthusiana, por definir que não há um crescimento acelerado da população, mas sim alterações periódicas que alternam crescimentos e desacelerações demográficos, podendo envolver, inclusive, períodos de estabilidade (KALACHE; VERAS; RAMOS, 1987).

Já a transição epidemiológica é caracterizada pela mudança do padrão das doenças e causas de mortalidade, saindo de um padrão de alta prevalência de doenças infecciosas e má nutrição, relacionadas a um saneamento ambiental precário, para um de predomínio de doenças degenerativas fortemente associadas ao estilo de vida (OMRAN, 2001), revelando assim uma grande mudança nos padrões de mortalidade específicos por idade e na expectativa de vida (POPKIN, 1994).

Por fim, a transição nutricional corresponde à mudanças na dieta e estado nutricional proposto por Popkin (1994), entendido como um fenômeno no qual ocorre uma inversão nos padrões de distribuição dos problemas nutricionais de uma dada população no tempo, ou seja, uma mudança na magnitude e no risco atribuível de agravos associados ao padrão de determinação de doenças atribuídas ao atraso e à modernidade, sendo em geral, uma passagem da desnutrição para a obesidade (KAC; VELÉSQUEZ-MELÉNDEZ, 2003).

A obesidade no mundo em desenvolvimento é reflexo de uma alteração profunda da sociedade nos últimos 20-30 anos, que promoveu modificações na dieta e um estilo de vida sedentário (FAO, 2012). Antes disso, foram relativamente poucas mudanças na dieta para os primeiros vários milhões de anos de existência da raça humana, onde a subsistência foi baseada principalmente em um padrão de coleta e caça fornecendo uma dieta variada, com baixo teor de gordura, alto teor de fibra e atividade física (POPKIN, 1994). Como consequência, os primeiros *Homo sapiens* caçadores-coletores eram mais altos e robustos, com menores deficiências nutricionais quando comparados aos que viviam em comunidades estabelecidas durante o período de agricultura, cuja dieta era mais simples e sujeita a grandes flutuações. Ainda de acordo com este autor, de 10 a 12 mil anos para cá, a Revolução Industrial e uma segunda Revolução Agrícola ocorrida na Europa entre os séculos

XVIII e XIX (a primeira ocorreu há 10 mil anos a.C.) levou a um incremento da produção e produtividade com uma redução considerável dos problemas de fome. Este período foi seguido por uma mudança nutricional acentuada, caracterizada por alto teor de gordura, pobre em fibras e rica em carboidrato refinado, dieta que marca a maioria das sociedades atuais (POPKIN, 1994).

Deste modo, a causa fundamental da obesidade e do sobrepeso é um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas, constatando-se um aumento da ingestão dos alimentos ricos em energia e gordura associado ao aumento da inatividade física devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, o qual exige menor esforço físico em comparação com o trabalho rural não mecanizado, além da mudança de meios de transporte e aumento da urbanização. Além disso, a inserção feminina no mercado de trabalho torna as mulheres ocupadas demais para comprar, preparar e cozinhar refeições saudáveis (WHO, 2018).

Tais mudanças nos padrões de atividade física e nutricional são resultado de mudanças ambientais e sociais oriundas do desenvolvimento econômico associadas à falta de políticas de apoio de setores como saúde, agricultura, transporte, planejamento urbano, meio ambiente, processamento alimentar, distribuição de alimentos e marketing (WHO, 2018). À medida que países pobres se tornaram mais prósperos, adquiriram não só os benefícios como também os problemas dos países industrializados, incluindo a obesidade. Áreas urbanas oferecem maior escolha de alimentos a preços mais baixos e industrializados, onde dietas tradicionais com grãos e vegetais são substituídas por refeições ricas em gordura e refinados, como o açúcar (FAO, 2012).

Mesmo ciente dos malefícios à saúde, empresas de alimentos não deixam de introduzir, em novos mercados, os mesmos alimentos que prejudicaram a saúde em países mais ricos. A maior disponibilidade de alimentos a preços mais baixos significa que os pobres têm acesso a uma dieta mais calórica. Na China, por exemplo, quando a renda per capita quadruplicou após as reformas econômicas do final da década de 1970, o consumo de alimentos ricos em gordura disparou. Em 1962, uma dieta contendo 20% da energia total da gordura correlacionou-se com um PIB per capita de US \$ 1.475. Em 1990, um PIB de apenas US \$ 750 se correlacionava com a mesma dieta. No México e no Brasil, onde o excesso de peso costumava ser um sinal de riqueza, agora muitas vezes marca a pobreza e enquanto a elite pode

optar por um estilo de vida saudável, os pobres têm menos escolhas alimentares e acesso mais limitado à educação nutricional (FAO, 2012).

2.2 OBESIDADE FELINA

Atualmente, os gatos vêm ganhando bastante interesse e espaço como animais de companhia. Esse fato iniciou-se em decorrência das mudanças no estilo de vida da população, que começou a viver em moradias com menor espaço físico e passar mais tempo fora de casa, porém sem perder a necessidade da companhia de um animal de estimação interativo, limpo e com certa independência.

A domesticação do gato trouxe consequências comportamentais significativas para a espécie, pois atualmente a maioria desses animais é mantida em espaços restritos, como casas fechadas e apartamentos. Além disso, muito do seu comportamento natural é coibido pelos proprietários, como subir em móveis, afiar as unhas, demarcar território, o que os torna sedentários. Associado a estes fatores, a alimentação inadequada predispõe ao desenvolvimento de sobrepeso e obesidade (MENDES et al., 2013). O espaço limitado pode não apenas induzir a obesidade por falta de exercício, mas também pelo aumento da ingestão induzida pela angústia causada pela falta de enriquecimento ambiental e incapacidade de expressar seu comportamento natural (STRICKLER; SHULL, 2014).

Assim como em humanos, a inatividade física resulta em uma diminuição da massa magra causando uma porcentagem relativamente maior do tecido adiposo corporal, apesar da aparência saudável do peso corporal. Esta obesidade sarcopênica pode levar, assim como em humanos, à *diabetes mellitus* tipo 2 e outras sérias comorbidades em felinos (HEBER et al., 1996). No âmbito da Saúde Única, provavelmente o mais importante tópico de saúde entre seres humanos e animais nos países ocidentais desenvolvidos seja o compartilhamento epidêmico da obesidade, diretamente relacionada a estilos de vida e ambiente em comum (DAY, 2010). Há muitos paralelos entre a obesidade humana e felina, uma vez que os animais são considerados membros da família e muitas vezes tratados como filhos ou parceiros. Semelhantes aos pais humanos, proprietários costumam oferecer petiscos e comidas extras a seus animais na busca de afeto e amor, o que pode torná-los viciados e dependentes: o animal pela comida, o humano pelo desejo de afeto (HAWN, 2006).

Quando o proprietário percebe que seu animal está obeso, procura conter a alimentação. Daí surgem os sintomas de abstinência: o animal, por não receber comida na quantidade ou tipo desejado, pode tornar-se agressivo ou dominante, morder, incomodar ou mostrar comportamentos negativos. Assim, o tutor é mantido refém dos alimentos e do animal para mantê-lo feliz (PRETLOW; CORBEE, 2016).

Os principais fatores de risco à obesidade felina incluem a raça, idade, gênero e estado reprodutivo. Sabe-se que gatos domésticos de pêlo curto e mestiços são majoritariamente afetados (LUND et al., 2005), enquanto o Abissínio parece não ser predisposto (DIEZ; NGUYEN, 2006). Com relação ao gênero e estado reprodutivo, machos são mais afetados do que as fêmeas, uma vez que evidenciam um índice metabólico em repouso mais baixo (BELSITO et al., 2009, DIEZ; NGUYEN, 2006). As alterações fisiológicas advindas da castração têm grande influência no desenvolvimento da obesidade, que resultam no aumento do apetite, na redução da energia metabólica, alterações na tolerância à glicose bem como aumento no número e tamanho dos adipócitos (ZORAN, 2010).

Dentre os vários métodos para avaliação da obesidade e determinação da condição corporal, o escore de condição corporal (ECC) mostrou-se útil, prático, rápido, subjetivo e simples. Nesse método utiliza-se uma escala com 9 pontos de classificação, de acordo com descrições de Laflamme (1997), que pontua o ECC avaliando-se as características visuais e palpação do animal. O gato caquético é considerado escore 1; magro escore 3; peso ideal escore 5; sobrepeso escore 7; e obeso escore 9.

Alguns medicamentos considerados polifágicos, como glicocorticoides, benzodiazepínicos, progestágenos e anti-epilépticos, podem induzir o aumento de peso, porém numa prevalência menor que 5% (ELLIOTT, 2006), e doenças hormonais envolvidas com a obesidade, como hiperadrenocorticismos e hipotireoidismo, embora comuns no cão, não são no gato (YIAGUIYAN-COLLIARD et al., 2008).

As consequências da obesidade felina são, em sua maioria, ocasionadas pela liberação das citocinas inflamatórias pelos adipócitos. A produção e a secreção desses fatores estão envolvidos com a resistência à insulina (HAUNER, 2004; LAFONTAN, 2005; TILG; MOSCHEN, 2006) além de uma variedade de outras condições que contribuem com a diminuição da qualidade e expectativa de vida, como a osteoartrite, dificuldade respiratória, distocia, intolerância ao calor, alguns tipos de

câncer, riscos anestésicos e complicações cirúrgicas (EDNEY; SMITH, 1986; FETTMAN et al, 1997; GERMAN, 2006).

Além disso, sabe-se que o tamanho dos adipócitos é limitado, e os que adquirem grandes proporções, além do esgotamento da capacidade de estocagem de gordura, tornam-se mais lipolíticos. Isto pode desencadear aumento na concentração de ácidos graxos livres no plasma e danificar a função de órgãos não adiposos, processo este reconhecido e identificado como lipotoxicidade (DeFRONZO, 2004).

2.3 O TECIDO ADIPOSEO E SEU PAPEL NA OBESIDADE

O desenvolvimento do tecido adiposo foi essencial para a evolução de mamíferos e aves. Diferente de outros tecidos corpóreos, sua massa possui considerável capacidade de expansão, o que pode ser uma vantagem no que se refere à reserva de energia, garantindo a sobrevivência do organismo durante períodos de fome ou na ausência de suprimentos adequados de comida em ambientes exigentes, ou uma desvantagem pelo aumento do risco de predação, já que seu acúmulo reduz a mobilidade e a chance de uma caçada bem sucedida. Deste modo, a massa adiposa está sob um controle rigoroso no organismo animal, e o ajuste do seu tamanho visa atender as duas principais ameaças da sobrevivência, que oscilam entre a fome e a predação (VERNON; DENIS; SORENSEN, 2001).

Os estoques de energia são intermitentemente consumidos durante o ciclo sono-vigília e nos períodos prolongados de fome ou doença. Para manter a função vital celular, humanos e outros mamíferos têm como estratégia consumir calorias além do requerimento das necessidades metabólicas imediatas e armazenar o excesso calórico como glicogênio, proteína ou lipídeos (AHIMA; FLIER, 2000).

Durante muitos anos, especificamente antes de 1950, o tecido adiposo foi considerado apenas como um órgão metabolicamente inerte, cujas funções eram somente o armazenamento de energia do organismo sob a forma de triglicerídeos, proteção, isolamento e importância cosmética (SUCHACKI; CAWTHORN; ROSEN, 2016). O excesso de energia consumido é convertido em moléculas de triglicerídeos, sob ação do hormônio insulina, enquanto na restrição energética, os estoques de energia são rapidamente mobilizados, sob a influência das catecolaminas e outros hormônios lipolíticos (GUIMARÃES et al., 2007). Com a crescente expansão da obesidade na população mundial, a atenção e o fomento à pesquisa a partir de países

desenvolvidos contribuiu para a maior compreensão da fisiologia do órgão adiposo, que hoje é tido como um órgão endócrino diretamente envolvido na regulação metabólica e nos intrincados mecanismos da obesidade.

A fisiologia do tecido adiposo branco pode ser agrupada em três principais categorias: metabolismo de lipídeos, metabolismo de glicose e funções endócrinas. Já o tecido adiposo marrom acumula lipídeos a partir do alimento como fonte de energia química, que pode ser liberada das células na forma de calor. Recentemente, novas descobertas sobre o significado fisiológico do tecido adiposo marrom e bege têm despertado interesse neste órgão como um instrumento potencial na luta contra a obesidade em humanos adultos. A compreensão dos mecanismos que caracterizam e diferenciam, ultraestruturalmente e fisiologicamente, o tecido adiposo branco, marrom e bege tem recebido especial atenção dentro deste campo de pesquisa (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005) e serão oportunamente detalhadas.

2.3.1 Origem e Composição Geral do Tecido Adiposo

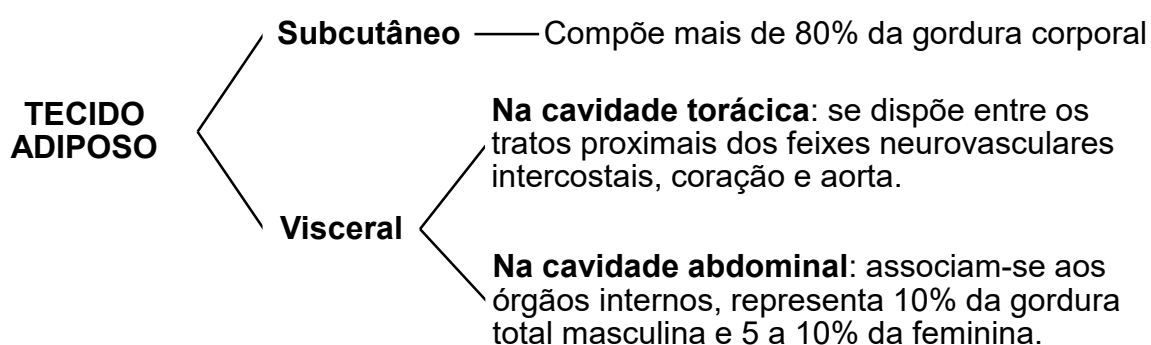
O tecido adiposo, assim como os músculos e ossos, é derivado do mesoderma, consistindo em células e uma matriz extracelular. Os componentes celulares são dois: os adipócitos (contendo elevado teor de lipídeos) e as células estromovasculares, representadas pelos pré-adipócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais, pericitos, macrófagos, células reticulares e células-tronco (GESTA; TSENG; KAHN, 2007). Apenas um terço do tecido adiposo contém adipócitos maduros. O restante é formado por uma combinação de vasos sanguíneos, nervos, fibroblastos, células imunes e células precursoras de adipócitos, conhecidas como pré-adipócitos (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005). Os elementos acelulares são compostos principalmente por fibras colágenas.

Os adipócitos maduros são classificados como branco, marrom e bege. Enquanto o tecido adiposo marrom e bege expressam mitocôndrias e a enzima termogênica desacopladora de elétrons, ou *uncoupling protein 1* (UCP-1), que os tornam especializados na dissipação de energia na forma de calor durante a termogênese induzida pelo frio e pela dieta, o tecido adiposo branco (TAB) está principalmente envolvido na estocagem de energia na forma de triacilglicerídeos (TAG), sendo o principal reservatório deste componente (QUEIROZ et al., 2009).

2.3.2 Anatomia e Distribuição

Apesar de sua ubiquidade, ou seja, a capacidade de estar presente ao mesmo tempo em vários lugares, o conjunto de depósitos adiposos é uma unidade funcional (HALBE; CUNHA, 2008), daí seu reconhecimento como um órgão: o órgão adiposo. É um dos maiores órgãos do organismo de seres humanos e outros mamíferos, representando cerca de 20% do peso corporal (8-18% nos machos, 14-28% nas fêmeas) podendo, no entanto, oscilar em extremos de cinco a 60 % do peso corpóreo (CINTI, 2005). Embora seu desenvolvimento inicie no estágio embrionário, a diferenciação completa ocorre somente após o nascimento. Neste período, o TAB pode ser encontrado em vários pontos anatômicos e coleções separadas, os chamados depósitos, presentes em vários locais anatômicos e envolvidos com o armazenamento de energia no corpo (GIORDANO et al., 2014; AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005), conforme demonstra a figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática da distribuição do tecido adiposo branco em mamíferos.



Fonte: a autora

Na cavidade abdominal, o tecido adiposo se classifica ainda como retroperitoneal e intraperitoneal. O retroperitoneal tem formato cônico alongado e se dispõe em posição paravertebral, entre a coluna vertebral e a parede abdominal posterior. É geralmente branco. O intraperitoneal é também conhecido como tecido adiposo visceral, está associado aos órgãos digestivos, e inclui por sua vez o omento (associado ao estômago), o mesentério (associado aos intestinos) e o epíplon (associado ao longo do cólon). Além dos compartimentos subcutâneo e visceral, o

TAB é também encontrado em pequenas quantidades ao redor de outros órgãos, tais como rins e genitália (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005).

2.3.3 Vascularização e Inervação

Nos mamíferos, cada depósito adiposo têm uma rede bem definida de vasos e nervos. O depósito mais amplamente investigado foi o subcutâneo anterior, que exhibe uma densa vascularização e inervação. Dois vasos alcançam bilateralmente o depósito a partir da artéria axilar, acompanhado por veias e nervos de diferentes tamanhos (CINTI, 2005). Um agrupamento de adipócitos brancos forma lóbulos de gordura, cada qual perfundido por uma arteríola e rodeado por um septo de tecido conjuntivo. A mais rica vascularização do tecido adiposo marrom (TAM), em comparação ao branco, somada à grande quantidade de mitocôndrias, confere sua coloração marrom característica (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005).

Os nervos menores são pouco mielinizados e contém um grande número de fibras noradrenérgicas, bem como fibras imunoreativas ao NPY, substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, geralmente encontrados em fibras sensoriais (CINTI, 2005). Tanto o TAB como o TAM são inervados por fibras noradrenérgicas do sistema nervoso simpático (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005). No TAB a maior parte das fibras se dirigem à parede dos capilares, enquanto no TAM fazem uma interface direta na membrana plasmática dos adipócitos. Estudos imunohistoquímicos e ultraestruturais conduzidos por Cinti (2005) mostram que as fibras inervam tanto os vasos dos capilares mais periféricos como também emite ramificações diretamente dentro do parênquima, caracterizando verdadeiras junções neuro-adipocitárias. Em comparação com o tecido adiposo branco, o marrom é mais ricamente vascularizado e inervado, não só por fibras simpáticas noradrenérgicas como também por fibras colinérgicas, pertencentes provavelmente ao sistema parassimpático (CINTI, 2005).

2.3.4 Adipogênese e o Desenvolvimento dos Diferentes Tecidos Adiposos

A adipogênese inicia-se pela organização de agrupamentos de células adipogênicas, angiogênicas e células estromais. Estes três tipos celulares envolvidos

no processo produzem o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF - *vascular endothelial growth factor*), que é responsável pelo aumento da circulação local. Se no embrião a angiogênese precede a adipogênese, no desenvolvimento pós-natal a expressão do VEGF no tecido adiposo está positivamente correlacionada com o seu tamanho, pois é ele que favorece as interações iniciais entre células endoteliais, macrófagos e precursores de adipócitos (HALBE; CUNHA, 2008). Os macrófagos contribuem para a adipogênese com a produção de citocinas adicionais, como os fatores de necrose tumoral ou *Tumoral Necrosis Factor- α* (TNF α) e o insulínóide de crescimento 1 (IGF-1 - *Insuline-like Growth Factor 1*) (NISHIMURA et al., 2007).

O crescimento do tecido adiposo branco requer um contínuo remodelamento da rede vascular, especificamente da rede capilar. Cada adipócito é rodeado por um ou mais capilares. A adipogênese levando à expansão do tecido adiposo e, portanto, à obesidade, ocorre tanto pela neovascularização (responsável pela hiperplasia dos adipócitos) quanto pela dilatação e remodelamento dos capilares pré-existentes (responsável pela hipertrofia dos adipócitos). Além do VEGF, muitos outros componentes pró ou anti-angiogênicos foram identificados no tecido adiposo, como o *Phosphatidylinositol-glycan class F* (PIGF), Ang-2, leptina, osteonectina, adiponectina, resistina, TNF- α , FGF-b (*Fibroblast Growth Factor-b*), IGF, *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) (LIJNEM, 2008). Os níveis séricos dos fatores angiogênicos, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e angiopoietina encontram-se significativamente aumentados em indivíduos obesos (SUDHAKAR et al., 2019).

A administração de inibidores do VEGF bloqueia a angiogênese, a adipogênese e o acúmulo de macrófagos (NISHIMURA et al., 2007), o que faz deles um alvo atrativo no controle da obesidade através da modulação da angiogênese. A angiostatina e a endostatina são exemplos de inibidores angiogênicos envolvidos na perda ponderal de ratos adultos, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos (NIJHAWAN et al., 2019).

Os adipócitos brancos são células esféricas, com diâmetro variando de 30 a 70 μm , de acordo com o depósito acumulado. Os lipídeos são organizados em grandes sacos lipídicos em uma única e grande gota unilocular ocupando quase todo o espaço intracelular, podendo exceder 50 μm . Contém poucas mitocôndrias e núcleos organizados na periferia, comprimidos pela gota lipídica juntamente com o citoplasma em um visível bordo ou margem fina. O TAB tem como principal função a reserva energética (GAGGINI; SAPONARO; GASTALDELLI, 2015). A massa de

adipócitos brancos controla, através da secreção do hormônio leptina, o comportamento individual da ingestão de alimentos.

O desenvolvimento do TAM em humanos inicia-se na 20ª semana de gestação e continua após o nascimento, fazendo parte de 1% do peso corporal. Em recém-nascidos e neonatos localiza-se na região interescapular, ao redor dos vasos, músculos e pescoço, nas axilas, ao longo dos grandes vasos, traquéia, esôfago torácico, ao redor da aorta abdominal, pâncreas, adrenal e rins (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005). Em pequenos mamíferos, tais como roedores, o TAM persiste por toda a vida. Em grandes mamíferos e humanos, contudo, o TAM sofre uma transformação morfológica no qual rapidamente acumula lipídios, torna-se unilocular e perde suas propriedades ultraestruturais e moleculares (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005), de modo que não pode ser encontrado no adulto. Contudo, estudos de imagens utilizando a tomografia por emissão de pósitrons (PET) identificou a presença de depósitos de gordura termogênica em indivíduos adultos (WANG; SEALE, 2016). Em gatos adultos, o tecido adiposo marrom foi identificado nas regiões interescapular, perirrenal, e subcutâneo caudal, o que serve de base para pesquisas sobre seu papel no metabolismo energético e como possível alvo terapêutico para a espécie, já que em outras espécies, como roedores, esse tecido apresenta ligação direta com o metabolismo energético. Em gatos, é possível que componentes dietéticos e farmacológicos exerçam alguma atividade metabólica sobre o tecido adiposo marrom (CLARCK et al., 2012).

Os lipídeos contidos nos adipócitos marrons são organizados em múltiplas e pequenas gotículas multiloculares. Suas células são poligonais, contendo um núcleo central. São relativamente menores do que os adipócitos brancos, com um diâmetro variando de 20 a 40µm (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2005). Além disso, são ricos em mitocôndrias grandes e características, contendo a proteína UCP1 (expressa unicamente nestas células), responsáveis pela fosforilação oxidativa, que por sua vez é responsável pela produção de calor neste tipo celular. Ambos os tipos celulares compartilham a propriedade de acúmulo e liberação de ácidos graxos, e ambos expressam um receptor adrenérgico específico, o receptor β_3 . Estes dois tipos celulares, organizados em dois tecidos, o tecido adiposo branco e o tecido adiposo marrom, estão contidos em um órgão de múltiplos depósitos como anteriormente citado: o órgão adiposo. Este órgão é composto por vários depósitos subcutâneos e viscerais. E todos eles são mistos, ou seja, compostos por tecido adiposo branco e

marrom. A quantidade relativa dos dois tecidos é o que confere sua cor. Ou seja, quando o tecido adiposo branco é prevalente, a cor é branca, e quando o tecido adiposo marrom é prevalente, a coloração é marrom. A coloração e, portanto, a composição celular de cada depósito ou parte dele, depende de vários fatores: idade, peso, espécie, condições ambientais e nutricionais. Em geral, o número de adipócitos marrons decresce com a idade, e os diferentes tipos de estímulo, tais como os estímulos nutricionais e as modificações da temperatura ambiente, são capazes de levar a modificações anatômicas dramáticas no órgão adiposo, o que denota sua notável plasticidade (WANG; SEALE, 2016).

Diferentes tipos de estímulos nutricionais e modificações na temperatura ambiental são capazes de determinar mudanças anatômicas dramáticas no órgão adiposo, dotado de notáveis propriedades plásticas (CINTI, 2005). A transdiferenciação é um fenômeno biológico em que as células se modificam fenotipicamente e fisiologicamente em outro tipo. Acredita-se que os adipócitos brancos e marrons possam transdiferenciar-se um em outro no órgão adiposo. A exposição ao calor acarreta uma redução da inervação simpática ao tecido adiposo marrom, resultando numa redução da produção de calor pelo mesmo. Durante esta transformação, observa-se redução da expressão gênica de UCP-1 e aumento da expressão de leptina. O contrário é verdadeiro, ou seja, a exposição ao frio e drogas adrenérgicas reduzem a leptinemia e induz a transformação de adipócitos brancos em marrons, bem como dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas (WANG; SEALE, 2016).

O jejum ou a restrição alimentar produz modificações orgânicas que variam de acordo com a sua duração. Quando prolongado, ocorrem mudanças envolvendo unicamente o componente branco via resposta tissular local. Adicionalmente, áreas em que alguns adipócitos se apresentam encolhidos podem ser observadas e são rodeadas por adipócitos aparentemente não afetados. Em graus extremos de deslipidação, os adipócitos brancos são alongados ou estrelados, e são ainda facilmente distinguíveis de outras células parenquimatosas, através da presença de invaginações na superfície celular, caracterizadas por abundantes vesículas pinocíticas. No jejum prolongado, adipócitos marrons repletos de lipídeos podem ser observados lado a lado dos adipócitos alongados. Esta é a evidência mais convincente de que, apesar de sua plasticidade, um pequeno componente de ambos os tipos celulares pode ser encontrado no interior do órgão (CINTI, 2005).

A exposição ao calor acarreta uma redução do direcionamento

simpático ao tecido adiposo marrom, levando a uma redução da produção de calor pelos adipócitos marrons. Morfológicamente, isto corresponde a uma transformação das células adiposas marrons em células similares aos adipócitos brancos. Durante esta transformação, observa-se uma redução da expressão do gene UCP1 e aumento da expressão da leptina. Isto sugere que a transformação morfológica é acompanhada por uma nova situação funcional, com a perda da habilidade termogênica dos adipócitos, concomitante à aquisição de propriedades fisiológicas dos adipócitos brancos, incluindo a produção de um hormônio tão importante como a leptina. Isto está alinhado com a observação de que os adipócitos marrons multiloculares clássicos sujeitos à estimulação adrenérgica expressam UCP1, mas não a leptina, enquanto a exposição ao frio e a administração de drogas adrenérgicas reduzem a leptinemia e induzem a transdiferenciação de adipócitos brancos em marrom. Portanto, acredita-se que a transdiferenciação e adipogenicidade seja alvo de implicações terapêuticas importantes para a obesidade e desordens relacionadas (WANG; SEALE, 2016).

Verificou-se que o alotransplante de TAM, que é mais abundante em bebês, tem sido utilizado para tratar vários modelos de doenças humanas em camundongos. Um único xenotransplante TAM de rato para camundongo não causou rejeição imunológica sistêmica, mas melhorou os índices indicativos da qualidade dos folículos e oócitos, aumentando significativamente a fertilidade de camundongos, sendo eficaz por mais de 5 meses (equivalente a 10 anos em humanos). Além disso, melhorou o metabolismo e a saúde geral dos ratos envelhecidos. Este estudo pode ser uma referência útil para o xenotransplante de TAM de parentes humanos próximos para a mulher (CHEN et al., 2019).

O tecido adiposo bege, por definição, contém o adipócito bege, que corresponde aos adipócitos que expressam UCP-1 fora dos depósitos tradicionais de tecido adiposo marrom, possuindo assim capacidade termogênica em resposta a vários estímulos. Estes adipócitos são denominados bege, brite (brown in white), iBAT (Bat induzido) ou wBAT (BAT adiposo branco) (WANG; SEALE, 2016). Apesar das similaridades entre tecido adiposo bege e marrom, com relação à sua capacidade termogênica e atividade aumentada sob estimulação de receptores adrenérgicos beta-3, a diferença mais marcante entre ambos é que o tecido adiposo marrom é mais termogênico, possuindo maior expressão de UCP-1 em comparação com o bege, o qual expressa componentes termogênicos apenas sob estimulação. Deste modo, o tecido adiposo bege tem um fenótipo flexível, podendo armazenar ou dissipar energia

dependendo do ambiente ou circunstâncias fisiológicas (WANG; SEALE, 2016). A ativação de adipócitos marrons e bege representam um alvo promissor no tratamento da obesidade, diabetes e outras doenças metabólicas (SUCHACKI; CAWTHORN; ROSEN, 2016).

Por fim, o tecido adiposo medular corresponde ao terceiro maior depósito de tecido adiposo, correspondendo a 70% do volume da medula óssea e 10% da massa gordurosa em indivíduos adultos saudáveis. Alcançou maior interesse a partir de 1970, quando se demonstrou que sua origem e composição lipídica diferia do tecido adiposo branco. Seu acúmulo está associado à osteoporose, envelhecimento, *diabetes mellitus* tipo 1, doença de *Cushing*, deficiência estrogênica e anorexia nervosa. Com os avanços tecnológicos no que se refere ao estudo de imagens, em particular a ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons, foi possível identificar duas populações de tecido adiposo medular (TAMe) de composição lipídica e expressão gênica distintas: o TAMe-r (regulado), presente no esqueleto proximal logo após o desenvolvimento pós natal, consistindo de adipócitos com hematopoiese ativa; e o TAMe-c (constitutivo), formando-se no estágio pós natal inicial em regiões distais, contendo adipócitos semelhantes ao TAB. O papel destas diferentes populações de TAMe ainda precisa ser definido. Contudo, sugere-se que o TAMe-c pode ter uma importante função no desenvolvimento dos vertebrados, enquanto o TAMe-r influencia a hematopoiese e o remodelamento do esqueleto. Evidências recentes identificam o TAMe como um órgão endócrino, contribuindo com a elevação sérica de adiponectina durante períodos de restrição calórica (CRAFT et al., 2018; SUCHACKI; CAWTHORN; ROSEN, 2016).

2.3.5 Moléculas Bioativas do Tecido Adiposo

Desde a identificação da leptina em 1994, o tecido adiposo deixou de ser tradicionalmente considerado apenas como um órgão de depósito de lipídeos, e passou a ser reconhecido verdadeiramente como um órgão de importantes funções endócrinas e metabólicas (ZORAN, 2010). Vários peptídeos bioativos, de ação autócrina, parácrina e endócrina foram descritos como produtos liberados pelo tecido adiposo e passaram a ser denominados genericamente como adipocinas ou adipocitocinas, em virtude de suas propriedades estruturais semelhantes às citocinas (LAFONTAN, 2005).

Dentre eles, destacam-se a leptina, a adiponectina, a adiposina, a resistina, o TNF- α , o inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1), as interleucinas 1 β , 6 e 8, o IGF-1, a proteína 1 quimioatrativa de macrófagos (MCP-1), a visfatina, entre outros. Com exceção quase que única da adiponectina, a produção e a secreção desses diversos fatores se intensificam com a obesidade e exercem ações tanto parácrinas, que instalam e perpetuam a inflamação local no tecido adiposo, quanto endócrinas, que induzem à resistência à insulina e a disfunções cardiovasculares (TILG; MOSCHEN, 2006; HAUNER, 2004; LAFONTAN, 2005), além de uma variedade de outras condições que contribuem com a diminuição da qualidade e expectativa de vida dos animais, como a osteoartrite, dificuldade respiratória, distocia, intolerância ao calor, alguns tipos de câncer, riscos anestésico e complicações cirúrgicas (GERMAN, 2006; EDNEY; SMITH, 1986; FETTMAN et al, 1997). A leptina (do grego *leptos*: magro), conforme demonstrado por Cooke e Naaz (2004), além de exercer seus efeitos de forma indireta através da expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos, pode inibir diretamente a lipogênese sendo, portanto, um determinante do número de adipócitos.

O papel da leptina no metabolismo do gato está claramente associado à sensibilidade à insulina e ao metabolismo da glicose (ZORAN, 2010). Seus efeitos hipofágicos resultam da ativação de neurônios anorexígenos, a pró-opiomelanocorticotropina (POMC) e o fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente (CART) e a inibição dos neurônios orexígenos: o NPY e o peptídeo relacionado à cepa agouti (AGRP) no núcleo arqueado do hipotálamo (HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998). Sua síntese é aumentada por glicocorticoides, infecção aguda e citocinas pró-inflamatórias, e diminuídas pela exposição ao frio, estimulação adrenérgica, hormônio do crescimento, hormônio tireoidiano, melatonina, cigarro e tiazolidinedionas. Suas concentrações séricas são maiores em fêmeas do que em machos, como resultado da sua inibição androgênica e estimulação estrogênica, bem como pelo maior depósito de tecido adiposo subcutâneo presente na fêmea, que é o local de maior produção circulante da leptina (AHIMA; FLIER, 2000).

2.4 O ESTRÓGENO E SUA PARTICIPAÇÃO NO MECANISMO DA OBESIDADE

Os esteroides gonadais estão entre os muitos fatores que influenciam

o apetite e o peso corporal em mamíferos, por serem importantes reguladores da captação e metabolismo energético. Seus efeitos hormonais são particularmente notáveis nas ratas, as quais mostram um grande aumento no consumo de alimento e peso corporal após a ovariectomia (ASARIAN E GEARY, 2002; WADE, 1975), enquanto que no período periovulatório do ciclo menstrual, marcado pelo aumento do estradiol, observa-se um significativo decréscimo da ingestão alimentar de 600 kcal por dia, podendo chegar a 250 Kcal, conforme relatado por Buffenstein et al. (1995). O papel central do estrógeno no controle da ingestão de alimentos e balanço energético em humanos é evidenciado pelo fato da incidência da obesidade aumentar grandemente após a menopausa (BUTERA, 2010), ou no caso de cães e gatos, após a castração. Sendo assim, estudos tanto em humanos quanto animais mostram que a ausência do estrógeno, seja pela menopausa ou castração, leva a alterações hormonais e reduções da taxa metabólica que culminam com o aumento do peso corporal e ao acúmulo de tecido adiposo (McGREEVY et al., 2005; EDNEY E SMITH, 1986; JEUNETTE et al., 2004). A reposição de doses fisiológicas de estrógeno em ratas, cobaias e macacos rhesus diminuiu a ingestão de alimento e o peso corporal (ASARIAN E GEARY, 2002; TARTTELIN E GORSKI, 1973; WADE, 1975; CZAJA E GOY, 1975).

Muitas evidências indicam que os efeitos do estrógeno na ingestão de alimentos são mediados por suas ações centrais e periféricas. As centrais ocorrem pelas interações em receptores nos centros neurobiológicos envolvidos no controle do apetite, encontrados no hipotálamo ventromedial (VMH), núcleo paraventricular (PVN) e romboencéfalo, na região caudal do núcleo do trato solitário (NTS) e ARC (THAMMACHAROEN et al., 2008; BUTERA; BEIKIRCH, 1989; PALMER; GRAY, 1986). As ações do estrógeno no comportamento alimentar ocorrem pela ativação dos seus receptores (ER), porém até 2001 não estava completamente elucidado por qual o subtipo de receptor, o ER α ou ER β , ocorriam os efeitos na alimentação. Alguns estudos sugeriam que fosse o ER β em ratas, enquanto em camundongos parecia ser o ER α (LIANG et al., 2002; GEARY et al., 2001). Em 2010, Rivera et al. comprovou que o efeito anorexigênico do estrógeno em ratos é mediado pela ativação de receptores centrais, e não periféricos. De acordo com Silva et al. (2010), o tratamento com estrógeno em ratas ovariectomizadas induziu um menor consumo alimentar, menor ganho de peso e concentrações plasmáticas de leptina, tanto antes quanto após a alimentação. Além disso, o estrógeno pode modificar a expressão de RNAm

para vários neuropeptídeos hipotalâmicos e receptores localizados no ARC, PVN e área hipotalâmica lateral (LHA).

As ações periféricas ocorrem pela interação do estrógeno com os sistemas peptidérgicos da ingestão de alimentos como CCK, NPY e grelina. O estrógeno amplifica os sinais de saciedade que surgem no decurso da refeição, através de suas interações com a CCK, um peptídeo hormonal liberado no intestino delgado durante as refeições que age em receptores CCK₁ no intestino, e cuja estimulação ativa fibras aferentes do nervo vago. Tais fibras estimulam estruturas neurais encefálicas (NTS, PVN) e resultam na cessação da ingestão de alimentos, que ocorre primariamente pela diminuição do tamanho da refeição (BUTERA, 2010).

O estrógeno também age atenuando os efeitos orexígenos da grelina e do NPY. A grelina é um peptídeo produzido no estômago, e suas concentrações encontram-se aumentados durante o jejum e diminuídos após a refeição. Sua administração estimula a fome em animais e humanos, mostrando tratar-se de um hormônio orexígeno. Ratos machos e fêmeas ovariectomizadas são mais sensíveis aos efeitos da grelina administrada via central ou periférica do que fêmeas intactas ou ovariectomizadas com reposição estrogênica (CLEGG et al., 2007).

O efeito do estrógeno no comportamento alimentar pode envolver uma atenuação dos sinais orexígenos, possivelmente pela modulação dos efeitos dos sinais periféricos da grelina nos neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos no controle da ingestão alimentar (por exemplo, o NPY). Experimentos realizados por Marangon et al. (2014) mostraram que o estrógeno modula as ações da leptina na homeostase energética, e esses efeitos são mediados, pelo menos em parte, por receptores tipo 2 do fator liberador de corticotropina (CRF-R2). O CRF é um neuropeptídeo anorexígeno, modulador da ingestão alimentar e do gasto energético, cuja síntese é influenciada pela leptina, que por sua vez eleva a ativação de neurônios CRF no PVN.

A remoção cirúrgica dos ovários leva a um ganho ponderal de 10-25%, especialmente no tecido adiposo branco, principalmente como resultado do aumento da ingestão alimentar associada à diminuição da atividade física e distúrbios metabólicos. A reposição estrogênica é capaz de manter o ganho de peso corporal semelhante ao de ratos intactos, pois está associada a um aumento na expressão de RNAm de CRF no PVN. De acordo com Wada et al., (2011), a enzima estrógeno sulfotransferase (EST), expressa no tecido adiposo branco, reduz dramaticamente a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, regulando a adipogênese e

exercendo papel fisiológico importante na diferenciação dos adipócitos e na prevenção da obesidade. Uma super-expressão de EST inibe, enquanto uma baixa expressão promove a diferenciação de adipócitos. Deste modo, a super-expressão *in vivo* da EST no tecido adiposo de ratas transgênicas resultou em adipócitos de menor tamanho e, portanto, em animais livres de obesidade.

A ação fisiológica do hormônio esteróide é, em grande parte, controlada pela concentração de seus receptores celulares. Ao contrário dos receptores de hormônios peptídicos, que são componentes únicos de cascatas complexas de transdução de sinal, os receptores esteróides transmitem o sinal diretamente ao DNA. O destino final do complexo hormônio-receptor é o núcleo celular e, juntamente com coativadores ou corepressores, ativa e controla a transcrição. Embora outras proteínas estejam envolvidas, o receptor é o fator limitante que determina a magnitude da resposta esteróide (VANDERBILT et al., 1987).

Estudos indicam que os níveis fisiológicos de receptores estrogênicos (RE) limitam a atividade transcricional do estrogênio bem abaixo da capacidade celular de responder ao estrogênio (WEBB et al., 1992). Esse papel central dos receptores de esteróides os tornam um ponto focal na regulação da função hormonal dos esteróides. O nível de RE nas células muda com diferentes estados fisiológicos. Na maioria dos casos, o principal regulador endócrino é o próprio ligante. Em um ciclo de *feedback* autoregulatório, o estrógeno induz um declínio na proteína RE e no mRNA (BERTHOIS et al., 1990; SANTAGI et al., 1997).

Vários mecanismos foram propostos para explicar como o estrogênio controla os níveis de RE, a maioria dos quais se concentra na regulação no nível do RNA. O foco nos mecanismos de transcrição baseia-se no pressuposto de que a diminuição da concentração de proteínas é em grande parte uma consequência da diminuição dos níveis de mRNA no estado estacionário. A regulação do RE pelo estrógeno tem sido documentada em vários sistemas, especialmente sobre os mecanismos que governam a regulação nos tecidos-alvo das linhas celulares do câncer de mama e do útero (ALARID; BAKOPOULOS; SOLODIN, 1999).

2.5 A MICROBIOTA E SUA RELAÇÃO COM A OBESIDADE

Por definição, microbiota são comunidades ecológicas de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos, encontrados em todos os

organismos multicelulares estudados até o momento, de plantas a animais. Microbiota inclui bactérias, arqueias, protistas, fungos e vírus. Verificou-se que a microbiota é crucial para a homeostase imunológica, hormonal e metabólica de seu hospedeiro. Já o termo microbioma descreve os genomas coletivos dos microrganismos que residem em um nicho ambiental ou os próprios microrganismos (BACKHED et al., 2005; TURNBAUGH et al., 2007). Quantitativamente, estima-se que o corpo humano seja habitado por dez vezes mais células microbianas do que as células humanas, uma vez que o microbioma humano inclui cerca de 100 trilhões de microorganismos, e que um humano adulto normalmente possui cerca de 10 trilhões de células humanas. No entanto, pesquisas recentes chegaram a uma nova estimativa do número de células humanas, de aproximadamente 37,2 trilhões, o que significa que a proporção entre células microbianas e humanas, se a estimativa original de 100 trilhões de células bacterianas estiver correta, é mais próxima de 3: 1 (ROSNER, 2014). Em 2016, outro grupo publicou uma nova estimativa da proporção de aproximadamente 1: 1 (1,3: 1, com "uma incerteza de 25% e uma variação de 53% sobre a população de homens com peso padrão de 70 kg") (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

Embora quantitativamente relevante, por causa do seu pequeno tamanho, os microorganismos representam apenas 1-3 % da massa do corpo. O projeto Microbioma Humano sequenciou, em 2012, o genoma da microbiota humana, concentrando-se particularmente na microbiota que normalmente habita a pele, boca, nariz, trato digestivo e vagina. Os pesquisadores calcularam que mais de 10.000 espécies microbianas ocupam o ecossistema humano e identificaram 81-99% dos gêneros, o que representa um conjunto que excede o número no genoma humano em uma magnitude de 150 (QIN et al., 2010).

O avanço da tecnologia e outras demandas impulsionaram o desenvolvimento de novas metodologias de sequenciamento em plataformas capazes de gerar informações sobre milhões de pares de bases em uma única corrida, gerando grande economia de tempo e custo, com melhor qualidade e maior capacidade de geração de informações. Esses novos métodos pertencem ao grupo de Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*). Dentre esses métodos, destacam-se o 454 Roche (pirossequenciamento), o Illumina, o Ion-torrent, o PacBio e o Nanopore (EDWARDS et al., 2006).

Em virtude da enorme quantidade de dados gerados pelo SNG, alguns

conceitos foram importados da ecologia com a finalidade de descrever com maior fidedignidade as comunidades microbianas, como os conceitos de riqueza e diversidade. O termo riqueza refere-se ao número de espécies obtido pela contagem ou estimativa da quantidade de espécies diferentes de bactérias que ocupam determinada amostra, e pode ser obtida pelo índice de Chao (KOZICH et al., 2013). A igualdade refere-se ao modo como as espécies estão distribuídas no ambiente. Essa diversidade refere-se à distribuição da frequência de cada espécie presente em um ambiente. Outro importante conceito, *operational taxonomic unit* (OTU) refere-se à unidade básica de classificação das bactérias, utilizada nos diferentes níveis taxonômicos (WEINSTOCK, 2012).

Muitas pesquisas relacionam a microbiota e seu envolvimento no controle do peso corporal e na homeostase energética (ZAMBOM, 2013). Em crianças obesas, evidenciou que as alterações na microbiota precedem o sobrepeso/obesidade infantil (SILVA; SANTOS; BRESSAN, 2013), o que desencadeou inúmeras pesquisas, principalmente em roedores. Uma das mais importantes foi induzida pelo transplante fecal, por meio da colonização de ratos magros *germ free* com a microbiota fecal de ratos obesos, o que resultou em aumento da gordura corporal, destacando a microbiota como fator envolvido na fisiopatologia da obesidade, por mecanismos ainda não completamente elucidados. O que se sabe até o momento é que a microbiota pode influenciar a eficiência energética dos nutrientes da dieta ou atuar como modulador gênico sobre as rotas que regulam o gasto energético (OLIVEIRA; HAMMES, 2016).

As diferentes composições da microbiota entre seres humanos magros e obesos reforçou a hipótese de sua participação na obesidade. No geral, vários pesquisadores têm apresentado relações entre a obesidade e dois filos bacterianos dominantes, os Firmicutes e Bacteroidetes. Ley et al. (2006) observaram uma maior razão entre Firmicutes/Bacteroidetes em indivíduos obesos, ou seja, há uma mudança na abundância destes dois filos havendo um aumento no filo Firmicutes e uma diminuição do filo Bacteroidetes. Por outro lado, pessoas magras e aquelas que perderam peso apresentaram maior número de Bacteroidetes (VERDAM et al., 2013).

Suspeita-se que a microbiota intestinal de indivíduos obesos apresenta peculiaridades que pode induzir a inflamação. Os lipopolissacarídeos (LPS), que compõem a parede celular de bactérias gram-negativas, são capazes de induzir resposta inflamatória de ataque e danificar a barreira intestinal, promovendo sua

entrada para a circulação através da difusão direta pelo aumento da permeabilidade intestinal ou por sua incorporação na estrutura dos quilomícrons. O aumento de suas concentrações circulantes, promovendo a endotoxemia, pode ativar a inflamação crônica em baixas doses afetando tecidos-alvo, como fígado, endotélio e tecido adiposo. Outras moléculas inflamatórias, como peptidoglicano, lipoproteínas e flagelinas, são produzidas pela microbiota (MOREIRA et al., 2012).

Acredita-se que o mecanismo envolvido na promoção da obesidade por certas populações bacterianas seja por meio da regulação do fator adiposo induzido pelo jejum (FIAF) liberado pelo epitélio intestinal, e que atua como inibidor da lipoproteína lipase (LPL), regulando o armazenamento da gordura periférica. Também por mecanismos não completamente conhecidos, a microbiota regula o metabolismo de energia no fígado e músculo a partir da fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Ainda, metabólitos microbianos como o ácido graxo de cadeia curta (SCFA) ligam-se a receptores conjugados de proteína C sobre as células epiteliais intestinais, controlando a resposta inflamatória do hospedeiro. A ativação de receptores imunes *Toll-simile* (TR5) em células mielóides ou em epitélios afeta a composição estrutural da microbiota, regulando o apetite, ganho de peso e sensibilidade insulínica (TILG; KASER, 2011).

Com base na revisão de literatura apresentada, entende-se como oportuna a inclusão de novos estudos envolvendo a reposição estrogênica, especialmente a longo prazo. A maioria dos trabalhos mais aprofundados encontrados na literatura são realizados em roedores e mulheres. Deste modo, pesquisas na espécie felina podem trazer um melhor entendimento da reposição hormonal, levando em consideração as particularidades espécie-específicas e suas metodologias mais apropriadas, tendo em vista que várias observações provenientes de diferentes autores podem compor um cenário mais completo e fidedigno na tríade obesidade-castração-microbiota.

3 REFERÊNCIAS

AHIMA, R.S.; FLIER, J. Adipose Tissue as an Endocrin Organ. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, n.8, p. 327-332, 2000.

ALARID, E. T.; BAKOPOULOS, N.; SOLODIN, N. Proteasome-Mediated Proteolysis of Estrogen Receptor: A Novel Component in Autologous Downregulation. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 9, p.1522–1534, 1999.

ASARIAN, L.; GEARY, N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feedings and sexual receptivity in ovariectomized rats. **Hormones and behavior**, v. 42, n. 4, p. 461-471, 2002.

AVRAM, A.S.; AVRAM, N. M.; JAMES, W. D. Subcutaneous fat in normal and diseased states 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. **Journal of American Academic Dermatology**, v.53, n. 4, p. 671-683, 2005.

BACKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1915-1920, 2005.

BACKUS, R. Plasma oestrogen changes in adult male cats after orchietomy, body-weight gain and low-dosage oestradiol administration. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. S1, p. S15-S18, 2011.

BAUER, U. E.; BRISS, P. A.; GOODMAN, R. A.; BOWMAN, B. A. Prevention of chronic disease in the 21 st. century: elimination of the leading preventable causes of premature death and disability in the USA. **The Lancet**, v. 384, n. 9937, p. 45-52, 2014.

BELSITO, K.R.; VESTER, B.M.; KEEL, T.; GRAVES, T. K.; SWANSON, K. S. Impact of ovariectomectomy and food intake on body composition, physical activity, and adipose gene expression in cats. **Journal of Animal Science**, v.87, n. 2, p. 594-602, 2009.

BERTHOIS, Y.; DONG, X. F.; ROUX-DOSSETTO, M.; MARTIN, P. M. Expression of estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid in the MCF-7 cell line: multiparametric analysis of its processing and regulation by estrogen. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 74, n. 1, p. 11-20, 1990.

BONAVERA, J. J.; DUBE, M. G.; KALRA, P. S.; KALRA, S. P. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v. 134, n. 6, p. 2367-2370, 1994.

BUTERA, P.C. Estradiol and the control of food intake. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 2, p. 175-180, 2010.

BUTERA, P. C.; BEIKIRCH, R. J. Central implants of dilute estradiol: independent effects on ingestive and reproductive behaviors of ovariectomized rats. **Brain Research**, v. 491, n. 2, p.266-273, 1989.

CAVE, N. J.; BACKUS, R. C.; MARKS, S. L.; KLASING, K. C. Oestradiol and genistein reduce food intake in male and female overweight cats after gonadectomy. **New Zealand veterinary journal**, v. 55, n. 3, p. 113-119, 2007.

CHEN, L.J.; YANG, Z. X.; WANG, Y.; DU, L.; LI, Y. R.; ZHANG, N. N.; GAO, W. Y.; PENG, R. R.; ZHU, F. Y.; WANG, L. L.; LI, C. R. Single xenotransplant of rat brown adipose tissue prolonged the ovarian lifespan of aging mice by improving follicle survival. **Aging cell**. v. 18, n.6, p.e. 3024, 2019.

CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 73, p. 9-15, 2005.

CLARK, M.; FERGUSON, D. C.; BUNICK, D.; HOENIG, M. Molecular and histologic evidence of brown adipose tissue in adult cats. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 66-72, 2012.

CLEGG, D. J.; BROWN, L. M.; ZIGMAN, J. M.; KEMP, C. J.; STRADER, A. D.; BENOIT, S. C.; WOODS, S. C.; MANGIARACINA, M.; GEARY, N. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1051-1058, 2007.

COOKE, P.; NAAZ, A. Role of estrogens in adipocyte development and function. **Experimental biology and medicine**, v. 229, n.11, p. 1127-1135, 2004.

CORBEE, R.J. Obesity in show cats. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 98, n.6, p. 1075-1080, 2014.

COUCIER, E. A.; O'HIGGINS, R., MELLOR, D. J.; YAM, P. S. Prevalence and risk factors for feline obesity in a first opinion practice in Glasgow, Scotland. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 10, p. 746-753, 2010.

CRAFT, C. S.; LI, Z; MacDOUGALD, O. A.; SCHELLER, E. L. Molecular differences between subtypes of bone marrow adipocytes. **Current molecular biology reports**. v. 4, n. 1, p. 16-23, 2018.

CZAJA, J. A.; GOY, R. W. Ovarian hormones and food intake in female guinea pigs and rhesus monkeys. **Hormones and Behavior**, v. 6, n. 4, p. 329-349, 1975.

DAY, M. J. One Health: the small animal dimension. **Veterinary Record**, v. 167, n. 22, p. 847-849, 2010.

DeFRONZO, R. A. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. **International journal of clinical practice**, v. 58, p. 9-21, 2004.

DEUSCH, O.; FLYNN, C.; COLYER, A.; SWANSON, K. S.; ALLAWAY, D.; MORRIS, P. A longitudinal study of the feline faecal microbiome identifies changes into early adulthood irrespective of sexual development. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0144881, 2015.

DIAS, P. C.; HENRIQUES, P.; ANJOS, L. A.; BURLANDY, L. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 7, p. e6016, 2017.

DIEZ, M.; NGUYEN, P. The epidemiology of canine and feline obesity. **Focus**, v. 16, n. 1, p. 2-8, 2006.

EDNEY, A. T.; SMITH, P. M.; Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, v. 118, n. 14, p. 391-396, 1986.

EDWARDS, R. A.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; WEGLEY, L.; HAYNES, M.; BREITBART, M.; PETERSON, D. M.; SAAR, M. O.; ALEXANDER, S.; ALEXANDER, E. C.; ROHWER, F. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. **BMC Genomics**, v. 7, n. 57, p. 57, 2006.

FETTMAN, M. J.; STANTON, C. A.; BANKS, L. L.; HAMAR, D. W.; JOHNSON, D. E.; HEGSTAD, R. L.; JOHNSTON, S. Effects of neutering on bodyweight, metabolic rate and glucose tolerance in domestic cats. **Research in veterinary science**, v. 62, n. 2, p. 131-136, 1997.

FISCHER, M. M.; KESSLER, A. M.; KIEFFER, D. A.; KNOTTS, T. A.; KIM, K.; WEI, A.; RAMSEY, J. J.; FASCETTI, A. J. Effects of obesity, energy restriction and neutering on the faecal microbiota of cats. **British Journal of Nutrition**, v. 118, n. 7, p. 513-524, 2017.

FLINT, H. J. Obesity and the gut microbiota. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 45, p. S128-S132, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. O diretor geral da FAO alerta para a “globalização da obesidade” e exorta o G20 a garantir dietas saudáveis através da regulamentação. Maio de 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/focus/and/obesity/obes2.htm>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The nutritiol transition and obesity. 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/focus/and/obesity/obes2.htm>

GAGGINI, M.; SAPONARO, C.; GASTALDELLI, A. Not all fats are created equal: Adipose vs. ectopic fat, implication in cardiometabolic diseases. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 22, n. 1, p. 7–18, 2015.

GEARY, N.; ASARIAN, L.; KORACH, D.S.; PLAFF, D. W; OGAWA, N. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER- α null mice. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4751-7, 2001.

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

GERMAN, A. J. Style over substance: what can parenting styles tell us about ownership styles and obesity in companion animals? **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S1, p. S72-S77, 2015.

GESTA, S.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242-256, 2007.

GIORDANO, A.; SMORLESI, A.; FRONTINI, A.; BARBATELLI, G.; CINTI, S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity or the adipose organ. **European Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 5, p. 1-39, 2014.

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

HALBE, H.W.; CUNHA, D.C. O excesso do órgão adiposo. **Revista Diagnóstico e Tratamento**, v. 13, p. 153-60, 2008.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiology and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 653-658, 2004.

HAWN, R. Canine weight management. **Veterinary technician**, v. 27, n. 9, p. 565-566, 2006.

HEBER, D.; INGLES, S.; ASHLEY, J. M.; MAXWELL, M. H.; LYONS, R. E.; ELASHOFF, R. M. Clinical detection of sarcopenic obesity by bioelectrical impedance analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 3, p. S472-S477, 1996.

HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 457-475, 1998.

JEUSETTE, I.; DETILEUX, J.; CUVELIER, C.; ISTASSE, L.; DIEZ, M. Ad libitum feeding following ovariectomy in female Beagle dogs: effect on maintenance energy requirement and on blood metabolites. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 88, n. 3-4, p.117-121, 2004.

KAC, G.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. S4-S5, 2003.

KALACHE, A.; VERAS, R. P.; RAMOS, L. R. O envelhecimento da população mundial: um desafio novo. **Revista de Saúde Pública**, v. 21, p. 200-210, 1987.

KALLUS, S. J.; BRANDT, L. J. The intestinal microbiota and obesity. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 46, n. 1, p. 16-24, 2012.

KINZLE, E.; BERGLER, R. Human-animal relationship of owners of normal and overweight cats. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1947S-1950S, 2006.

KOZICH, J. J.; WESTCOTT, S. L.; BAXTER, N. T.; HIGHLANDER, S. K.; SCHLOSS, P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform.

Applied and Environmental Microbiology, v. 79, n. 17, p. 5112–5120, 2013.

LAFLAMME, D. Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. *Feline Practice*, v. 25, p. 13-18, 1997.

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

LARSEN, J. A.; VILLAVARDE, C. Scope of the problem and perception by owners and veterinarians. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 46, n. 5, p. 761-772, 2016.

LEY, R. E.; TUMBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022, 2006.

LIANG, Y. Q.; AKISHITA, M.; KIM, S.; AKO, J.; HASHIMOTO, M. et al. Estrogen receptor β is involved in the anorectic action of estrogen. **International journal of obesity**, v. 26, n. 8, p. 1103-9, 2002.

LIJNEM, H. R. Angiogenesis and obesity. **Cardiovascular research**, v. 78, n. 2, p. 286-293, 2008.

LINDER, D.; MULLER, M. Pet obesity management: beyond nutrition. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 44, n. 4, p. 789-806, 2014.

LUND, E. M.; ARMSTRONG, P. J.; KIRK, C. A.; KLAUSNER, J. S. Prevalence and risk factors for obesity in adult cats from private US veterinary practices. **Internacional Journal of Research in Veterinary Medicine**, v. 3, n. 2, p.88-96, 2005.

MARANGON, P. B.; SILVA, S. E. C. M. D.; RORATO, R.; GOMIERO ALVES, P.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. K. Oestradiol modulates the effects of leptin on energy homeostasis by corticotrophin-releasing factor type 2 receptor. **Journal of neuroendocrinology**, v. 26, n. 1, p. 796-804, 2014.

McGREEVY, P. D.; THOMSON, P. C.; PRIDE, C.; FAWCET, A.; GRASSI, T., JONES, B. Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factor involved. **Veterinary Record**, v. 156, n. 22, p. 696-702, 2005.

MENDES, F. F.; RODRIGUES, D. F.; PRADO, Y. C. L.; ARAÚJO, E. G. Obesidade Felina. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 1602-1625, 2013.

MOREIRA, A. P. B.; TEIXEIRA, T. F. S.; PELUZIO, M. C. G.; ALFENAS, R. C. G. Gut microbiota and the development of obesity. **Nutricion Hospitalaria**, vl. 27, n. 5, p. 1408-1414, 2012.

NIJHAWAN, P.; MAKKAR, R.; GUPTA, A.; ARORA, S.; GARG, M.; BEHL, T. Insights into the role of Endostatin in Obesity. **Obesity Medicine**, v. 15, p.100120, 2019.

NISHIMURA, S.; MANABE, I.; NAGASAKI, M.; HOSOYA, M.; YAMASHITA, H.;

FUJITA, H.; OHSUJI, M.; TOBE, K.; KADOWAKI, T.; NAGAI, R.; SUGIURA, S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1517-1526, 2007.

OLIVEIRA, A. M.; HAMMES, T. O. Microbiota e barreira intestinal: implicações para a obesidade. **Clinical and biomedical research**, v. 36, n. 4, p. 222-229, 2016.

OMRAN, A. R. The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 2, p. 161-170, 2001.

PALMER, K.; GRAY, J. M. Central vs. peripheral effects of estrogen on food intake and lipoprotein lipase activity in ovariectomized rats. **Physiology & behavior**, v. 37, n. 1, p. 187-9, 1986.

PEDERSEN, S. D.; SJODIN, A.; ASTRUP, A.; Obesity as a health risk. *In*: **Present Knowledge in Nutrition**. 10 ed. Wiley-Blackwell, 2012. p. 709-720.

PENTEADO, J. O.; SALGADO, R. G. F.; BARLEM, E. A eficácia do tratamento da obesidade através do transplante da microbiota fecal de indivíduos magros. **Vitalle – Revista de ciências da saúde**, v. 29, n. 1, p. 46-53, 2017.

POPKIN, B. M. The nutrition transition in low-income countries: an emerging crisis. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 9, p. 285-298, 1994.

PRETLOW, R. A.; CORBEE, R. J. Similarities between obesity in pets and children: the addiction model. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 5, p. 944-949, 2016.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J. M.; HANSEN, T.; PASLIER, D.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N. YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIENSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBAACH, J.; METAHIT CONSORTIUM, BORK, P.; EHRlich, S. D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.

QIN, J.; LI, Y.; CAI, Z. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 49, p. 55-60, 2012.

QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F. B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 582-594, 2009.

RITCHIE, L. E.; BURKE, K. F.; GARCIA-MAZCORRO, J. F.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. **Veterinary microbiology**, v. 144, n.1-2, p. 140-146, 2010.

RIVERA, H. M.; ECKEL, L. A. Activation of central, but not peripheral, estrogen receptors is necessary for estradiol's anorexigenic effect in ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 151, n. 12, p. 5680-88, 2010.

ROESCH, D. M. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. **Physiology & behavior**, v. 87, n. 1, p. 39-44, 2006.

ROGERS, N. H.; PERFIELD, J. W.; STRISSEL, K. J.; OBIN, M. S.; GREENBERG, A. S. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2161-2168, 2009.

ROSNER, J. L. Ten times more microbial cells than body cells in humans? **Microbe**, v. 9, n.2, p. 47, 2014.

ROWE, E.; BROWNE, W.; CASEY, R.; GRUFFYDD-JONES, T.; MURRAY, J. Risk factors identified for owner-reported feline obesity at around one year of age: Dry diet and indoor lifestyle. **Preventive veterinary medicine**, v. 121, n. 3-4, p. 273-281, 2015.

SANTAGATI, S.; GIANAZZA, E.; AGRATI, P.; VEGETO, E.; PATRONE, C.; POLLIO, G.; MAGGI, U. M. A. Oligonucleotide squelching reveals the mechanism of estrogen receptor autologous downregulation. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 7, p. 938-949, 1997.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. "Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans". **Cell**, v. 164, n. 3, p. 337-340, 2016.

SILVA, L. E.; CASTRO, M.; AMARAL, F. C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 759-766, 2010.

SILVA, S.; SANTOS, C.; BRESSAN, J. Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics. **Nutrición Hospitalaria**. v. 28, n. 4, p: 48-1039, 2013.

SLINGERLAND, L. I.; FAZILOVA, V. V.; PLANTINGA, E. A.; KOOISTRA, H. S.; BEYNEN, A. C. Indoor confinement and physical inactivity rather than the proportion of dry food are risk factors in the development of feline type 2 diabetes mellitus. **The veterinary journal**, v. 179, n.2, p. 247-253, 2009.

STRICKLER, B. L.; SHULL, E. A. An owner survey of toys, activities, and behavior problems in indoor cats. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 9, n. 5, p. 207-214, 2014.

SUCHACKI, K. J.; CAWTHORN, W. P.; ROSEN, C. J. Bone marrow adipose tissue: formation, function and regulation. **Current opinion in pharmacology**, v. 28, p. 50-56, 2016.

SUKHAKAR, M.; SILAMBANAN, S.; PRABHAKARAN, A. A.; RAMAKRISHANAN, R.

Angiogenic Potential, Circulating Angiogenic Factors and Insulin Resistance in Subjects with Obesity. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, p. 1-8, 2019.

TARKOSOVA, D.; STORY, M. M.; RAND, J. S.; SVOBODA, M. Feline obesity–prevalence, risk factors, pathogenesis, associated conditions and assessment: a review. **Veterinární medicína**, v. 61, n. 6, p. 295-307, 2016.

TARTELLIN, M. F.; GORSKI, R.A. The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. **European Journal of Endocrinology**, v. 72, n. 3, p. 551-568, 1973.

TENG, K. T.; MCGREEVY, P. D.; TORIBIO, J. A. L.; RAUBENHEIMER, D.; KENDALL, K.; DHAND, N. K. Risk factors for underweight and overweight in cats in metropolitan Sydney, Australia. **Preventive veterinary medicine**, v. 144, p.102-111, 2017.

THAMMACHAROEN, S.; LUTZ, T. A.; GEARY, N.; ASARIAN, L. Hindbrain administration of estradiol inhibits feeding and activates estrogen receptor- α -expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1609-1617, 2008.

TILG, H.; KASER, A. Gut microbiome, obesity and metabolic dysfunction. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2126-2132, 2011.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n.10, p.772-783, 2006.

TURCONI, G.; CENA, H. Epidemiology of Obesity. *In*: Bagchi, D.; Preuss, H. G. **Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Preventing**. 2 ed. London: CRC Press, 2013. p. 3-32.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804-810, 2007.

VANDERBILT, J. N.; MIESFELD, R.; MALER, B. A.; YAMAMOTO, K. R. Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity. **Molecular Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 68-74, 1987.

VERDAM, F.; FUENTES, S.; JONGE, C.; ZOETENDAL, G.; ERBIL, R.; GREVE, W. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 21, n. 12, p: 15-607, 2013.

VERNON, R.G.; DENIS, R.G.P.; SORENSEN, A. Signals of adiposity. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, n. 4, p.197-214, 2001.

WADA, T.; IHUNNAH, C. A.; GAO, J.; CHAI, X. ZENG, S.; PHILIPS, B. J.; XIE, W. Estrogen sulfotransferase inhibits adipocyte differentiation. **Molecular endocrinology**, v.9, n. 9, p. 1612-23, 2011.

WADE, G.N. Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. **Journal of comparative and physiological psychology**, v 88, n. 1, p. 183, 1975.

WALL, M.; CAVE, N. J.; VALLEE, E. Owner and cat-related risk factors for feline overweight or obesity. **Frontiers in veterinary science**, v. 6, p-e 266, 2019.

WANG, W.; SEALE, P. Control of brown and beige fat development. **Nature**, v. 17, n.11, p. 691-702, 2016.

WARA, A.; HUNSUCKER, S.; BOVE, K.; BACKUS, R. Short-term estrogen replacement effects on insulin sensitivity and glucose tolerance in at-risk cats for feline diabetes mellitus. **PloS one**, v. 10, n.6, p.e0130696, 2015.

WEBB, P.; LOPEZ, G. N.; GREENE, G. L.; BAXTER, J. D.; KUSHNER, P. J.. The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response. **Molecular Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 157-167, 1992.

WEINSTOCK G. M. Genomic approaches to studying the human microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 250-256, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Classification of Diseases ICD-11, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/classifications/icd/en/>.

YIAGUIYAN-COLLIARD, L.; DIEZ, M.; GERMAN, A.; LLORET, A. Manejo da obesidade felina. **Veterinary focus**, edição especial, Royal Canin, 2008.

ZAMBON, R. Efeitos de suplementação de probióticos na prevenção da obesidade e suas complicações em camundongos swiss. p: 145 (tese). Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2013.

ZORAN, D. L. Obesity in Dogs and Cats: A Metabolic and Endocrine Disorder. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 40, n. 2, p. 221-239, 2010.

4 HIPÓTESES

Hipótese Nula (H0)

A castração promove o aumento do consumo alimentar e ganho de peso em gatas domésticas.

Hipótese Alternativa (H1)

A reposição hormonal restaura os efeitos hipofágicos do 17 β -estradiol, reduzindo o peso, melhorando o perfil metabólico do animal e restaurando a microbiota do fenótipo magro.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da reposição estrogênica na adiposidade e na microbiota fecal de gatas previamente castradas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar dois protocolos de reposição estrogênica oral (4 µg e 12 µg) a fim de verificar o de melhor controle da obesidade em gatas castradas.

Avaliar o efeito da reposição estrogênica no perfil bioquímico de gatas castradas.

Determinar possíveis diferenças morfométricas e morfológicas do tecido adiposo entre os animais castrados e não castrados.

Avaliar a diversidade da microbiota fecal entre os animais castrados e não castrados.

1 **6 ARTIGO A – Influence of estrogen replacement on adiposity and biochemical**
2 **profile of ovariectomized cats**

3
4 **ABSTRACT**

5
6 Surgical contraception drastically reduces gonadal hormones, increasing the risk of
7 obesity in felines by three to four times, which can be prevented or reversed by
8 exogenous estrogen replacement. The aim of this study was to observe the effects of
9 17 β -estradiol on food intake, weight gain, vaginal cytology, hematological /
10 biochemical profile and adipocyte morphology / morphometry in neutered cats in order
11 to verify its effectiveness in preventing and / or reversing obesity after castration. Eight
12 adult cats were divided into two groups: T (ovariectomized cats receiving
13 estrogenic replacement) and C (ovariectomized cats without estrogenic
14 replacement). The experimental period was divided into three periods: period before
15 the experiment (M0), experiment 1 (E1) and experiment 2 (E2). In E1, cats received
16 4 μ g of 17 β -estradiol for a period of 90 days. After an interval of 20 days, the same
17 animals were submitted to replacement with a dose of 12 μ g of 17 β -estradiol for 90
18 days (E2). Food intake and body weight was recorded daily and weekly, respectively.
19 Blood samples for hematological / biochemical tests and vaginal smear for
20 colpocytological examination were obtained every 45 days, under sedation.
21 Subcutaneous adipose tissue samples were collected under anesthesia at the
22 beginning of M0 and at the end of E1 and E2 for histological evaluation. In E1, group
23 T showed greater weight gain, despite transient hypophagia. The hypophagic effect
24 with 12 μ g replacement was transient but more accentuated, associated with the
25 presence of superficial cells in colpocytology and weight loss ($P = 0.03$). For group C,
26 hematological and biochemical tests were maintained within normal values, with an
27 increase in triglycerides ($P = 0.004$), AP ($P < 0.001$), GGT ($P = 0.002$), glucose (P
28 < 0.001) and total cholesterol ($P = 0.012$) between periods, as well as the adipocyte
29 area ($P = 0.026$). For group T, there was an increase in total cholesterol ($P = 0.012$),
30 AP ($P < 0.001$) and GGT ($P < 0.001$) between periods. In conclusion, long-term oral
31 estrogen replacement, at the dose of 12 μ g, promoted the appearance of superficial
32 cells in colpocytology, slight adiposity in histology and significant weight loss attributed
33 to greater energy expenditure, since food intake was unchanged between groups.

34
35 **Keywords:** Felines. Obesity. Castration. 17 β -estradiol valerate.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47

Artigo formatado de acordo com as normas da revista Domestic Animal Endocrinology.

48 Disponível em:

49 <https://www.elsevier.com/journals/domestic-animal-endocrinology/0739-7240/guide-for->
50 [authors](https://www.elsevier.com/journals/domestic-animal-endocrinology/0739-7240/guide-for-authors)

1 1. Introduction

2

3 Contraception by gonadectomy has become the procedure of choice for
4 population control programs, promoting health, well-being and longevity for the animal
5 [1]. As a counterpoint, the irreversible loss of reproduction organs leads to a drastic
6 reduction of gonadal hormones, affecting several organ systems [2].

7 In cats, the main consequence of castration is a three to four-fold increase in
8 the risk of obesity [3–5], especially if performed after six months of age [6], due to the
9 positive energy balance generated by the increase in caloric intake and decreased
10 energy expenditure [7].

11 The increase and redistribution of abdominal adipose tissue facilitates the fatty
12 acids mobilization into the liver, causing imbalances in liver function and the
13 appearance of metabolic complications [8,9]. When this occurs, it is necessary for the
14 pancreas to secrete more insulin in order to stimulate glucose cell uptake. Thus, in
15 addition to hyperglycemia there is a circulating increase in insulin, which in turn results
16 in increased lipogenesis and serum triglycerides leading to dyslipidemia and feline
17 hypertriglyceridemia. The latter is considered the most common finding in cats with
18 obesity [10]. The prolonged glycototoxicity resulted from hyperglycemia and lipotoxicity
19 resulted from increased serum concentrations of fatty acids induce pancreatic β cells
20 apoptosis, involved in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (DMT2) by
21 increasing interleukin-1 β secretion [11,12]. As a consequence of castration-induced
22 obesity, adipocyte hypertrophy and / or hyperplasia leads to the compression of blood
23 vessels in adipose tissue with local hypoxia and death of adipocytes, triggering a
24 cascade of inflammatory response with increased expression of inflammatory pro-
25 genes [13]. Associated with macrophages accumulation, there is an increase in
26 production and release of adipocytokines responsible for the installation and
27 perpetuation of local and systemic inflammation inducing insulin resistance,
28 mobilization of fatty acids, endothelial dysfunction and oxidative stress [3,14 –17]. The
29 chronic and subclinical inflammation causes incipient tissue damage through long-term
30 activation of the innate immune system, which can cause subsequent manifestation of
31 chronic non-transmissible diseases [16].

32 In human and animal models, mainly rodents, exogenous estrogen replacement
33 therapy has been shown to be beneficial in preventing or reversing homeostatic
34 damage caused by decreased serum estrogen concentration, induced by both

1 menopause and castration. Used in a personalized way and based on the risk profile,
2 estrogen replacement in women not only contributes to weight loss and improves the
3 metabolic profile, but also has an osteoprotective, cardioprotective, neuroprotective
4 and anticancer effect [18].

5 In cats of both sexes, studies validate low-dose estrogen and phytoestrogen
6 replacement in preventing weight gain and improving the post-castration metabolic
7 profile [19–21], but there is a lack of studies in long-term oral replacement in females.
8 Therefore, it is relevant to study the prolonged effects of replacement on this species
9 and genus. The aim of this study was to observe the effects of oral administration of
10 17 β -estradiol on food intake, weight gain, biochemical profile and adipocyte
11 morphology / morphometry in castrated cats, during a total period of six months using
12 doses of 4 μ g and 12 μ g, in order to verify the best result in preventing and / or reversing
13 the effects of post-castration obesity.

14

15 **2. Material and Methods**

16

17 This study was approved by the Committee of Ethics of Experimental Animals
18 of State University of Londrina (Protocol Number 5609.2017.46). All experimental
19 procedures were carried out in accordance with ethical principles of animal
20 experimentation, strictly observing the animal welfare recommendations for the feline
21 species.

22

23 *2.1 Animals*

24

25 Eight healthy short-haired mixed breed adult cats, one to eight years old, with
26 an average of 2.8 kg body weight (BW) and 3-5 body condition score (ECC) according
27 to Laflamme [22] obtained from adoption shelters were used. All of them were
28 submitted to an environmental, social, nutritional and sanitary 30-day-adaptation
29 period prior to the experiment.

30

31 *2.2 Inclusion and health management criteria*

32 The inclusion criteria of the animals were: being clinically healthy, with negative

1 results for FIV / FeLV tests (Snap test®), negative serology or with low titers for
2 toxoplasmosis (up to 1:256) and results of hematological and biochemical tests within
3 reference values for the species according to the institutional clinical pathology
4 laboratory. Based on these criteria, the animals were dewormed with broad-spectrum
5 vermifuge for three consecutive days, with reinforcement in 21 days (Vermivet cats®);
6 ivermectin for control of aural infestations of *Otodectes cynotis* (Ivomec®); a single
7 dose of feline trivalent vaccine associated with anti-rabies (Feligen®CRP / R); hygiene
8 care and spot-on application of insecticide for cat flea control (Effipro®).

10 2.3 Diet

12 Type of diet: A commercially available, complete and balanced, dry, feline
13 maintenance diet (Golden® adult cats) was offered. The nutritional composition
14 provided by the manufacturer (PremierR pets) was 31% crude protein, 12% ether
15 extract, 8% mineral matter, 3.5% fibrous matter, 3912 kcal / kg metabolizable energy.

16 Feed quantity: During the adaptation period (fig. 1), the feed supply was *ad*
17 *libitum*. After surgery, it was 100 grams per animal / day. Each animal remained in
18 individual cages during the feeding period, so that the leftover feed was weighed and
19 individual daily consumption recorded.

21 2.4 Environmental conditions

23 Animals were housed together in a clean room of 22 m², enriched with
24 cardboard boxes, toys, crumpled paper balls, scratching posts, common water
25 dispenser and circulating drinking fountains. The room temperature (22-24°C) and light
26 (12:12 light:dark) were controlled, with free access to water, food and cat litter. The
27 cats remained free throughout the adaptation period. In the experimental period (after
28 surgery), the animals remained loose between 7pm-7am with free access to water and
29 cat litter, confined between 7am-7pm in individual aluminum cages with 60 cm width x
30 47 cm height x 54 cm depth, lined with rubberized carpet, containing feeders and
31 drinking fountains. Before releasing them, individual food intake was recorded.

33 2.5 Experimental groups

1 After a 30-day adaptation period, a drawing was carried out to compose a
2 completely randomized design in a factorial scheme, to form two groups of four animals
3 organized according to treatment and constituted the following experimental groups:

4 - group T (Treatment): composed of ovariectomized females with
5 estrogen replacement based on 17 β -estradiol valerate in capsules, obtained from a
6 handling pharmacy.

7 - group C (Control): composed of ovariectomized females without
8 estrogenic replacement, receiving only the excipient content.

9 The anesthetic protocol for castration consisted of pre-anesthetic medication
10 based on morphine at 0.5 mg / kg associated with xylazine at 0.7 mg / kg and ketamine
11 at 15 mg / kg, intramuscularly (IM). For maintenance, ketamine at 7 mg / kg was used
12 intravenously (IV). Ovariectomy was performed in accordance with standard
13 procedures in the area of Teriogenology of Companion Animals at the institution. For
14 anesthetic recovery, 0.2 mg / kg of IM yohimbine was used. Pain control was performed
15 with ketoprofen medication at 1.0 mg / kg IV during the transoperative period and
16 maintained with the same oral dose once a day for two days. The antibiotic therapy
17 used was based on cefazolin at 30 mg / kg IV in a single dose during the transoperative
18 period.

20 2.6 *Experimental design*

21
22 The timeline shown in figure 1 marks three times: M0 (75 days long), E1 (90
23 days long) and E2 (90 days long). The moment before the replacement (M0) started
24 on day zero, which corresponds to obtaining the animals, followed by a 30-day-
25 adaptation period. Castration took place on the 30th and, after that date, both groups
26 underwent a management modification where they remained loose and together at
27 night (from 7:00 pm to 7:00 am) and arrested during the day (from 7:00 am to 7:00 pm)
28 to control food intake as previously mentioned. After 45 days, estrogen replacement
29 started at a dose of 4 μ g / animal, beginning experiment 1 (E1), which started on day
30 75 and ended on day 165. Later, with the same group of animals, the experiment 2
31 (E2) with estrogen replacement at a dose of 12 μ g / animal, from day 185 to day 275.
32 An interval of 20 days was made between the end of E1 and the beginning of E2, to
33 avoid the interference of an experiment on other.

1 Food intake and body weight were recorded daily and weekly, respectively.
2 Blood samples and vaginal smears were taken after a 12-hour fast every 45 days,
3 during E1 and E2, under IM acepromazine sedation at the dose of 0.03 mg / kg and
4 fentanyl at a dose of 50 µg / kg, or under an anesthesia protocol when performed
5 together with castration or with adipose biopsy. The blood samples were aliquoted in
6 dry plastic tubes and with EDTA. To obtain the serums, the dry tubes remained, after
7 harvesting, at room temperature for about 30 minutes and then subjected to
8 centrifugation and stored at -20 ° C in properly identified polypropylene microtubes. To
9 avoid circadian influences, all harvests were made at the same time on all animals.
10 Samples of white subcutaneous adipose tissue from the abdominal region were
11 collected at three times (days 30, 165 and 275) under intravenous anesthesia, for
12 histological analysis.

13

14 2.7 *Estradiol treatment*

15

16 Group T animals were treated with 4 µg (in E1) and 12 µg (in E2) of 17β-estradiol
17 valerate orally, administered daily and at the same time, half an hour after the
18 beginning of feeding. Simultaneously, animals in group C were treated with excipient.

19

20 2.8 *Parameters*

21 2.8.1 *Weight, ECC and food intake*

22

23 The animals were weighed weekly on a properly calibrated pediatric digital scale
24 (Ramuzza®) and weight gain was obtained by calculating the difference between final
25 and initial body weight for each of the three times (M0, E1 and E2). The values
26 presented were compacted by calculating the average for the different times. The ECC
27 was evaluated according to the parameters used by Laflamme [22] at the end of M0,
28 E1 and E2. Food intake was obtained by weighing the difference between the quantity
29 supplied (100 grams) and leftovers, using a properly calibrated digital scale. The
30 results were also compressed and presented using the average of the values for the
31 different times (M0, E1 and E2).

32

1 2.8.2 *Vaginal cytology*

2

3 Samples of vaginal smears were obtained using a gynecological brush. The
4 slides were stained with Rapid Panotic (Laborclin®) and examined in 40X
5 magnification. The cells were classified as parabasal, intermediate and superficial in
6 order to provide interpretations relevant to the hormonal phase and estrogenic stimulus
7 [23].

8

9 2.8.3 *Serum estrogen dosage*

10

11 Serum samples were stored at -80°C, and species-specific estrogen
12 measurements were performed by radioimmunoassay (RIE) method using the
13 BeckmanCoulter® ultra-sensitive estradiol kit. The intra-assay coefficient of variation
14 was 1.42 (low) and 3.20 (high).

15

16 2.8.4 *Hematological and biochemical tests*

17

18 The blood count was performed on the Poch-100 iv Dift equipment for veterinary
19 use (Sysmex®), associated with blood smear for differential leukocyte count and
20 estimate of the number of platelets. The serum measurement of glucose, urea,
21 proteins, triglycerides and cholesterol was performed using the colorimetric method.
22 Creatinine, ALT, AST, FA and GGT were measured by the kinetic method. All
23 biochemical measurements were carried out in a Dimension Expand plus automatic
24 analyzer (Siemens®), on the same day / period of the harvest and with the reagents
25 of the brand itself, as determined by the manufacturer.

26

27 2.8.5 *Histology*

28

29 Approximately one gram of white subcutaneous adipose tissue from the
30 abdominal region was removed in all animals, in the periods prior to replacement (M0)
31 and at the end of E1 and E2. For the procedure, animals were anesthetized following
32 the same protocol previously described for castration. The material was fixed in 4%
33 paraformaldehyde solution in phosphate buffered saline (pH 7.4), for 48 hours at 4°C,
34 then dehydrated in graded ethanol, clarified with xylol, and embedded in paraffin at

1 62°C. Using microtome, three sections per animal of 12 mm were obtained, and
2 stained with hemotoxilin and eosin. The images were captured with an image system
3 attached to the microscope, software Motic Images Plus 3.0 (Motic, Xiamen, China).
4 For the analysis of the volume (hypertrophy) and quantity (hyperplasia) of adipocytes,
5 the software “Image J” was used, with a minimum of 100 adipocytes (per animal) to
6 obtain tissue representativeness and fidelity of the results in determining the area of
7 the adipocytes (μm^2).

8 9 *2.8.6 Fate of animals after the experiment*

10
11 At the end of the experiment all cats were successfully donated. The criteria for
12 adoption followed the guidelines of responsible custody, such as screening windows
13 in apartments and continuing with the vaccination and deworming sanitary scheme.

14 15 *2.8.7 Data analysis*

16
17 All statistic analyses were performed using the Sigma Plot program. Shapiro
18 Wilk normality test was first performed. Data were analysed by *t*-test and analysis of
19 variance considering repeated measures to compare the groups and periods,
20 respectively. The Tukey test was performed to compare the effect of treatments in case
21 of significance. For all tests, a 5% significance level was used ($P < 0.05$). Data were
22 presented as mean \pm standard deviation of the mean and/or median (25th and 75th
23 percentile values).

24 25 **3. Results**

26
27 The results are presented in up to three times: M0 (period before estrogen
28 replacement), E1 (estrogen replacement period with the dose of 4 μg / animal) and E2
29 (estrogen replacement period with the dose of 12 μg / animal) . All animals remained
30 healthy and group T showed no adverse reaction with estrogen replacement therapy.

31 32 *3.1 Weight Gain and Food intake*

33
34 All animals showed increased weight gain throughout the experiment starting

1 from M0. The initial statistical difference in weights on day zero between the groups
2 ($P= 0.023$) was equalized over the period of nutritional adaptation, after which the
3 average weight was homogeneous between the groups and all cats had a body
4 condition score 5, considered ideal according to the Laflamme numerical scale [22]. At
5 the end of the experimental period, the percentage of weight gain in the groups was
6 substantially greater than 20%, representative of obesity according to Burkholder and
7 Toll [24].

8 There was no difference between groups for food intake in the period prior to
9 the experiment (Fig. 2B). In E1, group T showed, contrary to expectations, a significant
10 increase in consumption ($P= 0.003$) when compared to group C. As a result, the weight
11 of the cats in group T on day 165 (Table 1) showed a significant increase ($P= 0.034$).

12 In E2, food intake of the groups tended to be equal and, although without
13 statistical difference, there was a slight decrease in consumption by the T group
14 compared to E1. As a result, it is noted that the body weight of two cats receiving
15 replacement decreased from day 165 to day 275 (Table 1), which generated in E2 a
16 significant decrease in weight gain ($P= 0.003$) compared to group C. However, under
17 the effect of time, a decrease in weight gain from E1 to E2 was observed for both
18 groups ($P= 0.001$ in group T; $P= 0.040$ in group C) (Fig. 2A).

19 Analyzing the behavior of individual food intake of group T over time, in weeks
20 (Fig. 3), the treatment with 4 μ g of estradiol promoted a decrease in consumption in the
21 initial third of the experiment, corresponding to the first four weeks of treatment. Soon
22 afterwards, in the middle third, there was a consumption stabilization simultaneously
23 with a sharp decline by group C. In the final third, both groups increased consumption.
24 In E2, decreased consumption in initial third of the experiment was greater in group T,
25 followed by a gradual increase without stabilization. Likewise, in the OH group there
26 was an apparently rhythmic pattern of decrease followed by an increase on food intake,
27 which begins in the middle third of E1 and along E2.

28

29 3.2 *Blood count, biochemical tests and 17 β -estradiol dosage*

30

31 The hematimetric values were within the reference limits, demonstrating safety
32 of the doses used (Table 2). Biochemical measurements were, at all times, within the
33 reference values for the species (Table 3). In group C, the increase in triglycerides ($P=$
34 0.004), AP ($P < 0.001$), GGT ($P = 0.002$), glucose ($P < 0.001$), and total cholesterol (P

1 = 0.012) stands out between times. For group T there was an increase in total
2 cholesterol ($P = 0.012$), AP ($P < 0.001$), GGT ($P < 0.001$) and a decrease in creatinine
3 ($P = 0.042$). Regarding the dosage of estrogen, the low concentrations obtained in the
4 groups corresponded to the anestrus phase (Fig.4).

5

6 3.3 *Vaginal cytology*

7

8 In M0 (day 0) the groups presented varied colpocytological morphology. At the
9 end of E1 (day 165) there was a mixture of parabasal and intermediate cells in different
10 proportions in the groups. At the end of E2 (day 275) all cats in group C have only
11 parabasal cells, which is compatible with the absence of estrogenic stimulus promoted
12 by castration, while two cats in group T have superficial cells, reflecting the estrogenic
13 stimulus promoted by treatment with 12 μg (Table 4).

14

15 3.4 *Histology of adipose tissue*

16

17 There was no statistical difference between the groups regarding the area of
18 adipocytes. The effect of time, however, reveals an increase in the area between M0
19 and E2 for groups T ($P = 0.030$) and C ($P = 0.054$). The comparison of adipocyte
20 morphology in the previous period (day 30) and end of the experiment (day 275)
21 reveals a development of more pronounced cellular hypertrophy in group C (Fig. 5).

22

23 4. Discussion

24

25 The results of this study show that both groups had an increase on body weight
26 at E1, which makes gonadectomy an undeniable risk factor for feline obesity [25–27].

27 The choice of a dose of 4 μg per animal in E1 was based on previous work on
28 the feline species by Michael and Scott [28] and partially reproduced by Cave et al.
29 [20], showing its effects in reducing food intake while preserving vaginal cytology.
30 Replacement with estradiol alone, without progesterone, was based on studies
31 demonstrating that the use of estradiol alone reverses the hyperphagia induced by
32 ovariectomy [29,30]. Treatment with 17 β -estradiol valerate at a dose of 4 μg
33 per animal for three months did not result in decreased food consumption, weight loss
34 and appearance of superficial cells in vaginal cytology. Such results differ from the

1 pioneering studies by Cave et al. [20], who obtained hypophagia despite the absence
2 of surface cells with doses of 0.5 to 4 µg of estradiol in crystalline form, dissolved in
3 DMSO, diluted in oil and administered subcutaneously. However, in the methodology
4 used by this author, the duration of treatment was only five days, beginning on the 81st
5 day after castration, whereas in this study the replacement regimen was prolonged,
6 orally, with a duration of 90 days, starting 45 days after castration. There was, in the
7 short term, specifically in the first four weeks, a decrease in consumption in animals
8 treated with 4 µg of estradiol (Fig.3). However, with the continuity of treatment, this
9 effect was reversed.

10 At the dose of 12 µg of 17β-estradiol valerate, the decrease in consumption was
11 more pronounced (Fig. 3), followed by its increase without previous stabilization
12 observed in E1. This decrease on food intake in group T, both in E1 to a lesser extent,
13 and in E2 more sharply, could be attributed to the side effects of estrogen causing
14 nausea or malaise [20]. However, precautions were taken to avoid such effects: the
15 choice of dose, considered subphysiological to physiological; the clinical-hematological
16 monitoring of signs of estrogenic toxicity, which were absent; and administration of the
17 medication along with food. Therefore, the hypophagic effect obtained, although
18 transitory, was certainly attributed to estrogen, which generates, by different
19 mechanisms, a motivational change in obtaining energy for reproductive behaviors
20 [31].

21 Although the serum hormonal dosage of group T is comparable to group C,
22 replacement with 12 µg triggered the appearance of superficial cells in the
23 colpocytology caused by the estrogenic stimulus, indicating that this dose is close to
24 the physiological one. Associated with the presence of superficial vaginal cells,
25 significant weight loss occurred in group T ($P = 0.03$). Low serum hormonal
26 concentrations may result from the short half-life of estrogen, approximately 13 hours,
27 so that by the time of blood collection, after a 12-hour fast, they would be completely
28 metabolized and conjugated [32].

29 The statistical differences observed both in hematological exams and in
30 biochemical measurements were not clinically relevant, considering the wide ranges
31 of reference values for the species. Even so, it is interesting that the group C has
32 increased concentrations of triglycerides ($P = 0.004$) and ALT (from 49 U / L in M0 to
33 100 U / L in E2), while the replacement with 12 µg kept them in decline (Table 2). The
34 increase in TG and ALT are indications of hepatic lipid accumulation and, unlike the

1 criteria adopted for the laboratory diagnosis of human metabolic syndrome, it is
2 proposed to increase serum concentrations of ALT, TG, insulin, LDH and decrease in
3 adiponectin as more suitable for the feline species [12]. It is not known when the serum
4 concentrations of ALT and TG reach high levels. However, since there was already an
5 increasing elevation of these enzymes in group C and stabilization in group T, it is
6 possible that with the continuity of measurements together with other laboratory
7 parameters, it was possible to detect more pronounced elevations that met the
8 inclusion criteria for the feline metabolic syndrome for group C, but not for group T.

9 Another intriguing fact is that, as in group T, group C also showed a decreased
10 consumption followed by an increase in an oscillation pattern (Fig. 3). The most
11 plausible explanation for the hypophagy periods of this group would be the activation
12 of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, which becomes more active in obese
13 individuals, increasing adrenal androgen production. It is known that, in women,
14 abdominal obesity is associated with hyperandrogenemia with elevation of urinary 17-
15 keto steroids [33], and the hyperresponsiveness of adrenal androgens to the
16 corticotrophic stimulus is demonstrated by the increase in dehydroepiandrosterone
17 (DHEA), followed by its aromatization in adipose tissue. Considering that
18 androstenedione is the main substrate for peripheral formation of estrogens and is
19 converted to estrone, there is an increase in the estrone / estradiol ratio. In addition,
20 estrone can also be converted to estradiol in the adipose tissue itself by 17b-
21 hydroxysteroid-dehydrogenase activity [34].

22 In cats, Correa et al. [35] found that the concentration of circulating estrogen in
23 ovariectomized females did not differ from non-ovariectomized females until nine
24 months after castration, being attributed to adrenal activation. Only at 12 months,
25 hormonal concentrations were significantly lower in castrated cats compared to non-
26 ovariectomized cats.

27 If the decrease in food intake occurred in both groups, regardless of estrogen
28 replacement, significant weight loss in group T is based on a single explanation: the
29 greater energy expenditure promoted by replacement with 12 µg. In rodents, studies
30 show that estrogen increases energy expenditure by increasing lipolysis and
31 thermogenesis in brown adipocytes [36,37]. Its thermogenic action on brown adipose
32 tissue is modulated via AMP-activated protein kinase (AMPK), on the ventromedial
33 nucleus of the hypothalamus and on the sympathetic nervous system, in addition to
34 the direct action on brown adipocytes affecting adrenergic receptors and mitochondrial

1 biogenesis. The result of these actions is a catabolic response, linked to increased
2 temperature, energy expenditure and weight loss [38].

3 Although the present study has not determined energy expenditure, it is known
4 that gonadectomy in cats is responsible for the lowest thermal coefficient and highest
5 body mass, body score and amount of fat. The resting metabolic rate decreases 33%
6 for females and 28% for males [4–6]. In addition, the reduction in physical activity due
7 to the limited spaces in which cats generally live, such as in small apartments, as well
8 as the lack of stimuli and environmental enrichment combined with long periods of
9 sleep, is also a relevant factor [39]. In women, neurons containing estrogenic receptors
10 (ER α) in the ventromedial hypothalamus promote hormone-dependent locomotor
11 activity, favoring energy homeostasis [40]. Impaired development of these neurons or
12 hormonal depletion could induce inactivity contributing to human obesity and probably
13 in other mammalian species.

14 With the results obtained in this study, it is concluded that the treatment with 17
15 β -estradiol at a dose of 12 μ g / animal after castration proved to be effective in
16 controlling adiposity, being attributed to a greater energy expenditure promoted by
17 replacement.

18

19 **Acknowledgments**

20 This work had the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
21 de Ensino Superior (CAPES), Brazil.

22

23 **Declaration of Competing Interest**

24 The authors have nothing to disclose.

25

26 **References**

27

- 28 [1] Greer KA, Canterbury SC, Murphy KE. Statistical analysis regarding the effects
29 of height and weight on life span of the domestic dog. *Res Vet Sci* 2007;82:208–
30 14. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.06.005>.
- 31 [2] Devitt CM, Cox RE, Hailey JJ. Duration, complications, stress, and pain of open
32 ovariohysterectomy versus a simple method of laparoscopic-assisted
33 ovariohysterectomy in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:921–7.
34 <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.921>.
- 35 [3] Fettman MJ, Stanton CA, Banks LL, Hamar DW, Johnson DE, Hegstad RL, et
36 al. Effects of neutering on body weight, metabolic rate and glucose tolerance of
37 domestic cats. *Res Vet Sci* 1997;62:131–6. <https://doi.org/10.1016/S0034->

- 1 5288(97)90134-X.
- 2 [4] Kanchuk ML, Backus RC, Calvert CC, Morris JG, Rogers QR. Neutering Induces
3 Changes in Food Intake, Body Weight, Plasma Insulin and Leptin
4 Concentrations in Normal and Lipoprotein Lipase–Deficient Male Cats. *J Nutr*
5 2002;132:1730S-1732S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1730s>.
- 6 [5] Nguyen PG, Dumon HJ, Siliart BS, Martin LJ, Sergheraert R, Biourge VC. Effects
7 of dietary fat and energy on body weight and composition after gonadectomy in
8 cats. *Am J Vet Res* 2004;65:1708–13.
9 <https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.1708>.
- 10 [6] Spain CV, Scarlett JM, Houpt KA. Long-term risks and benefits of early-age
11 gonadectomy in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2004;224:372–9.
12 <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.372>.
- 13 [7] Wei A, Fascetti AJ, Kim K, Lee A, Graham JL, Havel PJ, et al. Early effects of
14 neutering on energy expenditure in adult male cats. *PLoS One* 2014;9:3–4.
15 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089557>.
- 16 [8] Bouchard C, Despreis JP, Maurieige P. Genetic and nongenetic determinants of
17 regional fat distribution. *Endocr Rev* 1993;14:72–93.
18 <https://doi.org/10.1210/edrv-14-1-72>.
- 19 [9] Wajchenberg BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to
20 the Metabolic Syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697–738.
21 <https://doi.org/10.1210/er.21.6.697>.
- 22 [10] Hatano Y, Mori N, Asada M, Mori A, Yamamoto I, Muranaka S, et al.
23 Hypertriglyceridemia with increased plasma insulin concentrations in cats. *Res*
24 *Vet Sci* 2010;88:458–60. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.12.012>.
- 25 [11] Maedler K, Spinass GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Fatty Acids
26 on β -Cell Turnover and Function. *Diabetes* n.d.:69–76.
- 27 [12] Maedler K, Halban PA, Donath MY, Maedler K, Sergeev P, Ris F, et al.
28 [Http://Firststrays.Com/Free-Information/Potting-Mounting-Displaying/Particle-](http://Firststrays.Com/Free-Information/Potting-Mounting-Displaying/Particle-)
29 Packing/. 2017;110:851–60. <https://doi.org/10.1172/JCI200215318>. Introduction.
- 30 [13] Neels JG, Olefsky JM, Nbdspqibhft BOE. * Ogmbnfe Gbu Xibu Tubsut Uif Gjsf
31 2006;116:1–3. <https://doi.org/10.1172/JCI27280.there>.
- 32 [14] Aouadi M, Tencerova M, Vangala P, Yawe JC, Nicoloso SM, Amano SU, et al.
33 Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body
34 metabolism in obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:8278–83.
35 <https://doi.org/10.1073/pnas.1300492110>.
- 36 [15] Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role.
37 *Proc Nutr Soc* 2005;64:163–9. <https://doi.org/10.1079/pns2005428>.
- 38 [16] Lahoz C, Mostaza JM. Atherosclerosis: A systemic disease. *Eur Geriatr Med*
39 2013;4:185–7. <https://doi.org/10.1016/j.eurger.2013.02.006>.
- 40 [17] Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue,
41 inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6:772–83.
42 <https://doi.org/10.1038/nri1937>.
- 43 [18] Kenemans P, van Unnik GA, Mijatovic MJ, van der Mooren MJ. Perspectives in
44 hormone replacement therapy. *Med J Indones* 2001;10:182–6.
45 <https://doi.org/10.13181/mji.v10i3.557>.
- 46 [19] Backus R. Plasma oestrogen changes in adult male cats after orchietomy,
47 body-weight gain and low-dosage oestradiol administration. *Br J Nutr*
48 2011;106:S15–8. <https://doi.org/10.1017/s0007114511001796>.
- 49 [20] Cave NJ, Backus RC, Marks SL, Klasing KC. Oestradiol and genistein reduce
50 food intake in male and female overweight cats after gonadectomy. *N Z Vet J*

- 1 2007;55:113–9. <https://doi.org/10.1080/00480169.2007.36752>.
- 2 [21] Wara A, Hunsucker S, Bove K, Backus R. Short-term estrogen replacement
3 effects on insulin sensitivity and glucose tolerance in at-risk cats for feline
4 diabetes mellitus. *PLoS One* 2015;10:1–16.
5 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130696>.
- 6 [22] Laflamme D. Development and validation of a body condition score system for
7 cats: a clinical tool. *Feline Pract* 1997;25:13–8.
- 8 [23] Johnston SD, Kustriz MVR, Olson PNS. *Canine and Feline Theriogenology*. 1
9 edition. Saunders Elsevier; 2001.
- 10 [24] Burkholder WJ, Toll PW. Burkholder, W. J. Toll, P. W. *Small Anim. Clin. Nutr.*,
11 2000.
- 12 [25] Lund E, Armstrong P, Kirk C, Klausner J. Prevalence and risk factors for obesity
13 in adult dogs from private us veterinary practices. *Int J Appl Res Vet Med*
14 2006;4:177.
- 15 [26] Courcier EA, O'Higgins R, Mellor DJ, Yam PS. Prevalence and risk factors for
16 feline obesity in a first opinion practice in Glasgow, Scotland. *J Feline Med Surg*
17 2010;12:746–53. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.05.011>.
- 18 [27] Cave NJ, Allan FJ, Schokkenbroek SL, Metekohy CAM, Pfeiffer DU. A cross-
19 sectional study to compare changes in the prevalence and risk factors for feline
20 obesity between 1993 and 2007 in New Zealand. *Prev Vet Med* 2012;107:121–
21 33. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.05.006>.
- 22 [28] Michael BRP, Scott PP. Fromt the Department of Psychiatry , Institute of
23 Psychiatry , Maudsley 1964:254–74.
- 24 [29] Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and
25 restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in
26 ovariectomized rats. *Horm Behav* 2002;42:461–71.
27 <https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1835>.
- 28 [30] Geary N, Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test
29 meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1999;67:141–7.
30 [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00060-8).
- 31 [31] Richard JE, López-Ferreras L, Anderberg RH, Olandersson K, Skibicka KP.
32 Estradiol is a critical regulator of food-reward behavior.
33 *Psychoneuroendocrinology* 2017;78:193–202.
34 <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.01.014>.
- 35 [32] Shille VM, Haggerty MA, Shackleton C, Lasley BL. Metabolites of estradiol in
36 serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*
37 1990;34:779–94. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90032-O](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90032-O).
- 38 [33] Kopelman PG. 4 Hormones and obesity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*
39 1994;8:549–75. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(05\)80286-1](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80286-1).
- 40 [34] KOPELMAN PG, PILKINGTON TRE, WHITE N, JEFFCOATE SL. Abnormal Sex
41 Steroid Secretion and Binding in Massively Obese Women. *Clin Endocrinol (Oxf)*
42 1980;12:363–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1980.tb02721.x>.
- 43 [35] Correa EAA de A, Baraldi-Artoni SM, Neves C de C, Jimenez KN, Pacheco MR,
44 Oliveira D, et al. Avaliação hormonal de gatas ovariectomizadas e não
45 ovariectomizadas. *Rev Científica Eletrônica Med Veterinária* 2009;13:1–8.
- 46 [36] Richard D. Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose
47 tissue thermogenesis. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 1986;250.
48 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1986.250.2.r245>.
- 49 [37] Kamei- Y, Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama-kasaoka N. Ovariectomy in Mice
50 Decreases with Increased Lipid Tissue and Skeletal Fat Muscle Gene in Adipose

- 1 Body 1 National Institute of Health and Nutrition 2 PRESTO , Japan Science and
2 Technology OVX induced obesity Sixteen mice were ovariectomized (OVX mice
3) a 2005:110–7.
- 4 [38] Xu Y, López M. Central regulation of energy metabolism by estrogens. *Mol*
5 *Metab* 2018;15:104–15. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.012>.
- 6 [39] Strickler BL, Shull EA. An owner survey of toys, activities, and behavior problems
7 in indoor cats. *J Vet Behav Clin Appl Res* 2013;9:207–14.
8 <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2014.06.005>.
- 9 [40] Correa SM, Newstrom DW, Warne JP, Flandin P, Cheung CC, Lin-Moore AT, et
10 al. An estrogen-responsive module in the ventromedial hypothalamus selectively
11 drives sex-specific activity in females. *Cell Rep* 2015;10:62–74.
12 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.011>.
- 13

1 **Table 1:** Body weight (BW) (kg) and body condition score (ECC) of the cats in groups (T and C), on days zero, 30, 165 (at the end of
 2 E1) and 275 (at the end of E2), with the final weight gain (WG) (in kg and%).
 3

GROUP	Day zero		Day 30		Day 165		Day 275		P value	Final WG (Kg)	Final WG (%)
	BW (Kg)	ECC	BW (Kg)	ECC	BW (Kg)	ECC	BW (Kg)	ECC			
Animal 1	3.90	5	4.07	5	4.89	6	5.00	7		1.10	28.00
Animal 2	2.60	3-4	3.09	5	3.82	6	3.40	6		0.80	30.00
T Animal 3	3.50	5	3.99	5	4.45	7	4.35	7		0.85	54.00
Animal 4	2.80	3-4	3.30	5	4.23	6	4.25	6		1.45	51.00
Mean±sd	3.20±0,60 ^{Ac}		3.61±0,49 ^{Ab}		4.35±0,45 ^{Aa}		4.25±0,66 ^{Aa}		<0,001	1.05±0,30	40.75±13,65
Animal 1	2.80	3-4	2.99	5	3.44	6	3.65	6		0.85	30.00
Animal 2	2.70	4	3.04	5	3.61	6	3.80	6		1.10	40.00
C Animal 3	2.50	4-5	3.49	5	3.84	6-7	3.85	7		1.35	54.00
Animal 4	2.30	3-4	3.04	5	3.80	6-7	3.80	7		1.50	65.00
Mean±sd	2.57±0,22 ^{Bc}		3.14±0,23 ^{Ab}		3.67±0,18 ^{Ba}		3.77±0,08 ^{Aa}		<0,001	1.20±0,28	47.25±15,39
P value	0.023		0.133		0.034		0.202			0.494	0.551

4
 5 Group T, cats submitted to ovariectomy and supplemented with estrogen; Group C, cats submitted to ovariectomy. E1, experiment 1; E2,
 6 experiment 2.

7 Capital letters in the columns represent difference between groups, and lower-case letters in the lines differ between the times.

8 Equal letters in columns and rows do not differ significantly ($P > 0.05$) (n = 8).
 9
 10
 11
 12
 13

1 **Table 2:** Hematological values of red blood cells (x10⁶ / μ L), hemoglobin (g / dL), hematocrit (%), leukocytes (x10³ / μ L), platelets
 2 (x10³ / μ L) and RDW (%), (with their respective values of reference), in the groups (T and C) before (M0) and during estrogen
 3 replacement with 17 β -estradiol at the dose of 4 μ g (E1) and 12 μ g (E2).
 4

PARAMETER (REFERENCE)	GROUP	M0		E1			E2		P value
		Day 0	Day 75	Day 120	Day 165	Day 230	Day 275		
HE (x10 ⁶ / μ L) (5-10)	T	8.37 (7.65-9.27) ^{Aa}	7.28 (6.92-7.85) ^{Aa}	8.25 (7.80-8.59) ^{Aa}	8.24 (7.12-9.51) ^{Aa}	8.56 (7.81-9.34) ^{Aa}	8.83 (8.28-9.04) ^{Aa}	0.355	
	C	8.08 (6.97-9.00) ^{Aa}	6.42 (6.30-6.99) ^{Ab}	8.38 (7.69-8.99) ^{Aa}	7.88 (7.18-8.46) ^{Aa}	8.30 (7.98-8.88) ^{Aa}	8.69 (8.37-9.50) ^{Aa}	0.018	
	P value	0.586	0.147	0.775	0.606	0.807	0.635		
HG (g/dL) (8-15)	T	11.10 (10.70-12.10) ^{Aa}	9.65 (9.25-10.15) ^{Aa}	10.65 (10.05-11.15) ^{Aa}	10.65 (9.50-11.65) ^{Aa}	11.05 (9.95-11.85) ^{Aa}	11.00 (10.60-11.40) ^{Aa}	0.304	
	C	11.10 (9.30-12.55) ^{Aa}	8.80 (8.60-9.30) ^{Aa}	10.75 (10.15-11.30) ^{Aa}	10.00 (8.85-11.00) ^{Aa}	10.90 (9.85-11.85) ^{Aa}	11.70 (10.65-12.40) ^{Aa}	0.076	
	P value	0.695	0.093	0.829	0.503	0.954	0.437		
HT (%) (24-45)	T	34.55 (33.05-37.55) ^{Aa}	29.85 (28.85-31.40) ^{Aa}	32.70 (30.75-33.80) ^{Aa}	31.70 (28.75-35.80) ^{Aa}	33.55 (29.20-38.35) ^{Aa}	31.95 (29.15-32.65) ^{Aa}	0.424	
	C	33.60 (29.10-38.45) ^{Aa}	27.30 (26.05-29.05) ^{Aa}	30.95 (28.85-32.60) ^{Aa}	29.45 (25.50-31.45) ^{Aa}	32.30 (30.87-33.35) ^{Aa}	33.40 (30.80-35.20) ^{Aa}	0.156	
	P value	0.646	0.646	0.646	0.646	1.000	0.351		
LEU(x10 ³ / μ L) (5,5-19,5)	T	9.90 (8.90-11.95) ^{Aa}	10.25 (9.40-12.30) ^{Aa}	9.75 (8.50-14.35) ^{Aa}	9.55 (9.20-11.15) ^{Aa}	12.35 (9.75-14.30) ^{Aa}	8.20 (7.60-9.90) ^{Aa}	0.172	
	C	8.20 (6.85-9.05) ^{Aa}	7.35 (6.25-8.55) ^{Ba}	8.50 (7.20-10.10) ^{Aa}	8.10 (7.00-12.15) ^{Aa}	10.30 (8.30-13.50) ^{Aa}	10.00 (8.65-12.05) ^{Aa}	0.511	
	P value	0.118	0.029	0.305	0.797	0.676	0.309		
PLA(x10 ³ / μ L) (300-600)	T	716.50 (657.50-732.50) ^{Aa}	410.00 (405.00-460.00) ^{Ac}	667.50 (558.00-768.00) ^{Aab}	367.50 (327.00-510.00) ^{Ac}	416.50 (362.00-457.00) ^{Ac}	445.50 (414.00-504.00) ^{Ab}	0.002	
	C	450.00 (420.00-517.50) ^{Ba}	595.00 (520.00-612.50) ^{Aa}	582.00 (373.50-699.00) ^{Aa}	378.00 (300.00-451.50) ^{Aa}	431.50 (410.00-546.50) ^{Aa}	444.50 (401.00-526.50) ^{Aa}	0.171	
	P value	0.004	0.024	0.344	0.623	0.310	0.939		

5
 6 T, cats submitted to ovariectomy and supplemented with estrogen; C, cats submitted to ovariectomy. E1, experiment 1; E2, experiment 2.

7 Capital letters in the columns represent difference between groups, and lower-case letters in the lines differ between the times.

8 Equal letters in columns and rows do not differ significantly ($p > 0.05$) ($n = 8$). Data expressed as median (minimum-maximum).
 9
 10
 11

1 **Table 3:** Serum values of alkaline phosphatase (AP), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyltransferase (GGT), urea,
 2 creatinine, proteins, glucose, triglycerides and cholesterol, with their respective reference values, in the different groups before (M0)
 3 and during estrogen replacement with 17 β -estradiol at a dose of 4 μ g (E1) and 12 μ g (E2).
 4

PARAMETER (REFERENCE)	GROUP	M0			E1			E2		P value
		Day 0	Day 75	Day 120	Day 165	Day 230	Day 275			
AP (6-93U/L)	T	28 (24.25-44.50) ^{Ac}	28.50 (24-46) ^{Ac}	34 (26-53.50) ^{Ac}	37 (24.50-54) ^{Ac}	50.50 (41-68.50) ^{Aab}	47.50 (42.50-59) ^{Ab}	<0.001		
	C	16 (14.25-24.50) ^{Ac}	23 (13.50-32.50) ^{Ac}	30 (21-40) ^{Ac}	26.50 (21-36.50) ^{Ac}	42 (38.50-48.50) ^{Aa}	45 (39.50-47) ^{Aab}	<0.001		
	P value	0.059	0.305	0.471	0.410	0.312	0.349			
ALT (1-64 U/L)	T	56.00 (36-108) ^{Aa}	54 (34-97.50) ^{Aa}	57.50 (40-88) ^{Aa}	62 (38-94.50) ^{Aa}	53 (32-106.50) ^{Aa}	52 (33-100.50) ^{Aa}	0.907		
	C	75.50 (49-117) ^{Aa}	78.50 (60-88) ^{Aa}	70 (54.50-98.50) ^{Aa}	79 (60-100.50) ^{Aa}	75.50 (55-81) ^{Aa}	113.50(78-122) ^{Aa}	0.516		
	P value	0.789	0.771	0.601	0.582	0.968	0.462			
GGT (0-3 U/L)	T	7.00 (6.00-8.00) ^{Aa}	2.00 (1.50-2.50) ^{Ab}	3.00 (1.50-5.50) ^{Aa}	10 (9.50-10.50) ^{Aa}	7.00 (6.00-8.75) ^{Aa}	9 (8.50-9.50) ^{Aa}	0.004		
	C	5.00 (4.50-7.00) ^{Aa}	2.05 (1.50-3.55) ^{Ab}	2.50 (1.75-6.50) ^{Ab}	10.50 (10-12) ^{Aa}	5.00 (5.00-7.25) ^{Aa}	8 (6.50-8.50) ^{Aa}	0.004		
	P value	0.356	0.602	0.802	0.267	0.114	0.168			
UREA (21.4-64.2 mg/dL)	T	42 (38.50-46.50) ^{Aa}	46 (39.50-50.50) ^{Aa}	48.50 (42.50-52.50) ^{Aa}	52.50 (46-57.50) ^{Aa}	48.00 (38.00-51.25) ^{Aa}	47.50 (39-49) ^{Aa}	0.09		
	C	48 (43-52.50) ^{Aab}	53 (45.50-54.40) ^{Ab}	55.50 (48.50-59.50) ^{Aab}	59.50 (51.50-61) ^{Aa}	55.50 (43.00-57.50) ^{Aab}	54.50 (46.50-60.50) ^{Aab}	0.038		
	P value	0.203	0.404	0.238	0.434	0.200	0.183			
CREATININE (0-1.5 mg/dL)	T	1.10 (0.75-1.40) ^{Ab}	1.05 (0.90-1.35) ^{Aab}	1.15 (0.85-1.45) ^{Aab}	1.25 (0.90-1.60) ^{Aab}	1.35 (0.92-1.70) ^{Aa}	1.25 (0.82-1.75) ^{Aab}	0.042		
	C	1.35 (1.20-1.55) ^{Aa}	1.35 (1.25-1.45) ^{Aa}	1.35 (1.30-1.55) ^{Aa}	1.45 (1.40-1.65) ^{Aa}	1.45 (1.40-1.72) ^{Aa}	1.50 (1.35-1.65) ^{Aa}	0.235		
	P value	0.233	0.263	0.217	0.686	0.686	0.886			
PROTEINS (6-8 g/dL)	T	7.75 (7.60-8.00) ^{Aab}	7.00 (6.45-7.45) ^{Ac}	7.75 (7.40-8.02) ^{Aab}	7.95 (7.65-8.35) ^{Aab}	8.00 (7.80-8.15) ^{Aab}	7.25 (6.90-7.50) ^{Ac}	0.001		
	C	7.45 (6.60-7.90) ^{Aab}	6.60 (6.20-7.05) ^{Ac}	7.60 (7.02-8.17) ^{Aab}	7.90 (7.70-8.05) ^{Aab}	7.65 (7.55-7.85) ^{Aa}	7.25 (6.90-7.50) ^{Aab}	0.014		
	P value	0.351	0.486	0.886	0.620	0.177	1.000			
GLUCOSE (70-110 mg/dL)	T	90.00 (84.50-111.50) ^{Aa}	100 (86.50-173.50) ^{Aa}	67.50 (55-75) ^{Aa}	62 (54-91) ^{Aa}	90 (84-100) ^{Aa}	114 (91.50-147) ^{Aa}	0.178		
	C	95.00 (79.00-102.50) ^{Aabc}	119.00(107-151) ^{Aab}	70.50 (67.50-73) ^{Ac}	69 (67-72) ^{Ac}	96 (89.50-100) ^{Aabc}	123.50 (100-151) ^{Aab}	<0.001		

	<i>P</i> value	0.635	0.982	0.470	0.845	0.696	0.810	
	T	34.00 (27-37) ^{Aa}	34.50 (28.50-37) ^{Aa}	40.50 (33-58) ^{Aa}	45 (40.50-52.50) ^{Aa}	38.00 (32.50-43.50) ^{Aa}	33.00 (29.75-51.25) ^{Aa}	0.354
TG (35.4 mg/dL)	C	24.50 (21.50-28) ^{Abc}	19.50 (17.50-28) ^{Ac}	36.00 (32-41) ^{Aab}	39.50 (31-46) ^{Aab}	36 (28.50-50.50) ^{Aab}	39.00 (35.25-50.25) ^{Aa}	0.006
	<i>P</i> value	0.152	0.117	0.362	0.294	0.863	0.343	
	T	123.50 (83.75-168.50) ^{Aab}	87 (72-116) ^{Ac}	111.00 (96-134) ^{Aabc}	119.50 (103-141.50) ^{Aabc}	122.50 (104-141.50) ^{Aabc}	135 (109.50-163.50) ^{Aa}	0.012
CHOLESTEROL (95-130 mg/dL)	C	88.00 (66.50-111.00) ^{Ac}	74 (70-87.50) ^{Ac}	86.00 (82.50-110) ^{Aabc}	108.50 (101.50-123) ^{Aab}	96.50 (89.50-113.50) ^{Aabc}	119 (109.00-127.50) ^{Aab}	<0.001
	<i>P</i> value	0.486	0.363	0.318	0.516	0.224	0.686	

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

T. cats submitted to ovariectomy and supplemented with estrogen; C. cats submitted to ovariectomy. E1. experiment 1; E2. experiment 2.
Reference values used by the Institutional Laboratory.
Capital letters in the columns represent difference between groups. and lower-case letters in the lines differ between the times.
Equal letters in columns and rows do not differ significantly ($p > 0.05$) ($n = 8$)
Data expressed as median (minimum-maximum).

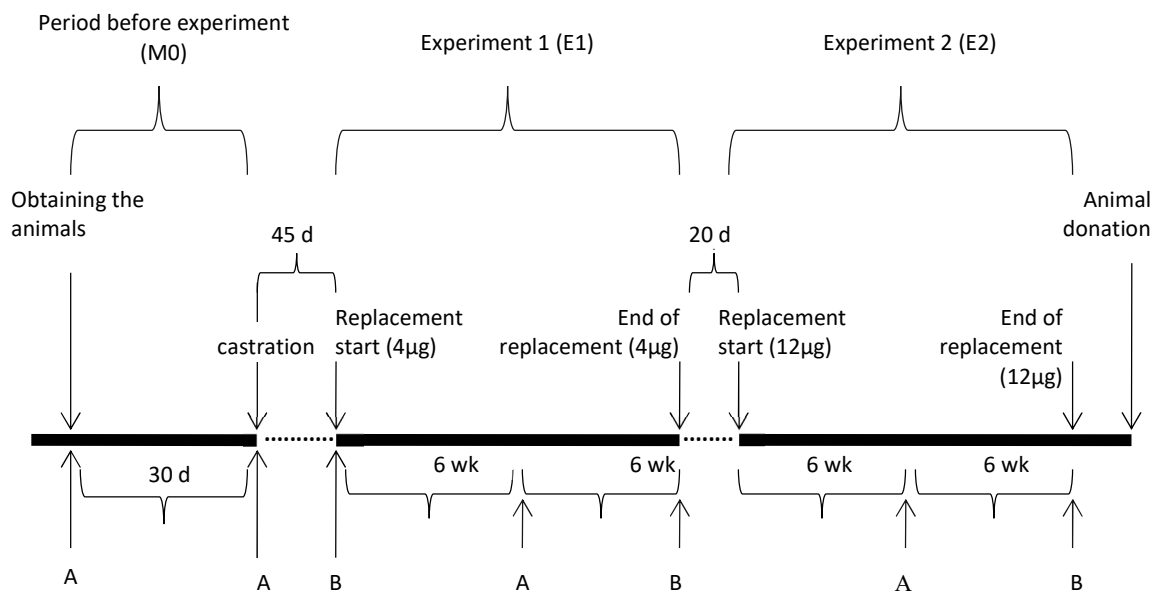
Table 4 - Predominant cell type in the vaginal cytology of the cats in the different groups (T and C) and moments (days 0, 165 and 275).

Group	Animal	Day 0	Day 165 (final E1)	Day 275 (final E2)
T	1	Intermediate (30%) and superficial (70%)	Parabasal	Superficial
	2	Parabasal (20%) and intermediate (80%)	Parabasal (90%) and intermediate (10%)	Intermediate (10%) and superficial (90%)
	3	Parabasal (10%) and intermediate (90%)	Parabasal (90%) and intermediate (10%)	Parabasal (95%) and intermediate (5%)
	4	Intermediate (30%) and superficial (70%)	Parabasal (80%) and intermediate (20%)	Parabasal (95%) and intermediate (5%)
C	1	Intermediate (90%) and superficial (10%)	Parabasal (95) and intermediate (5%)	Parabasal
	2	Superficial	Parabasal (90%) and intermediate (10%)	Parabasal
	3	Parabasal	Parabasal	Parabasal
	4	Parabasal (90%) and intermediate (10%)	Parabasal (95%) and intermediate (5%)	Parabasal

T: cats submitted to ovariectomy and supplemented with estrogen; C: cats submitted to ovariectomy. M0: period prior to the experiment; E1: experiment 1; E2: experiment 2.

4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1

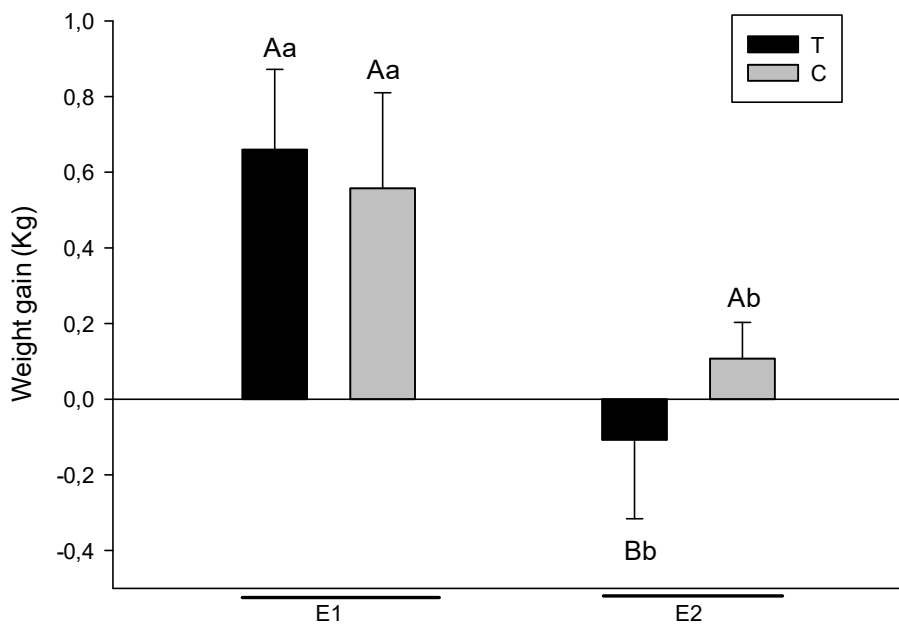


A: Blood collection + colpocytology
 B: Blood collection + colpocytology + adipose tissue biopsy

2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32

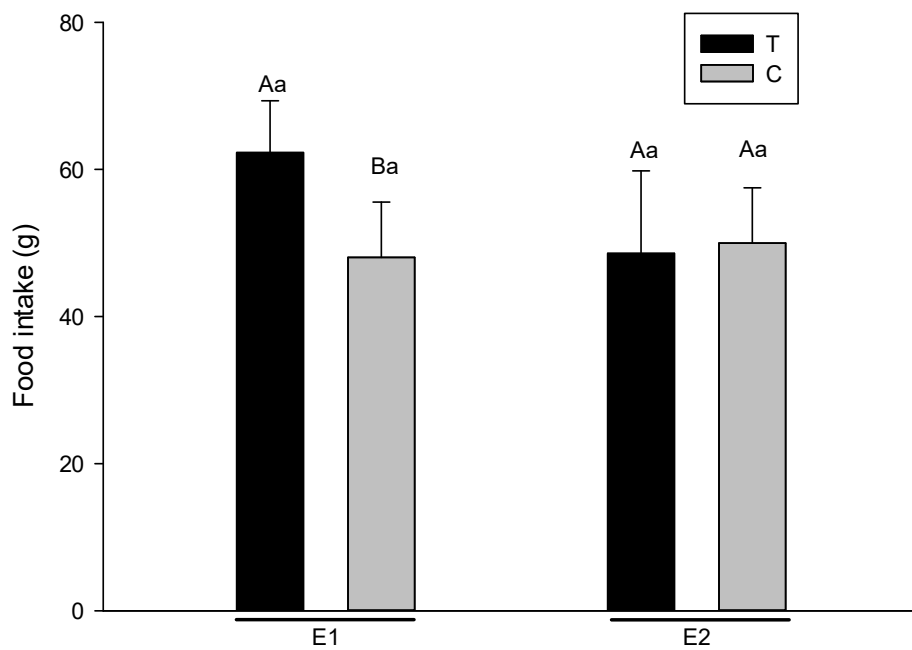
1

A)

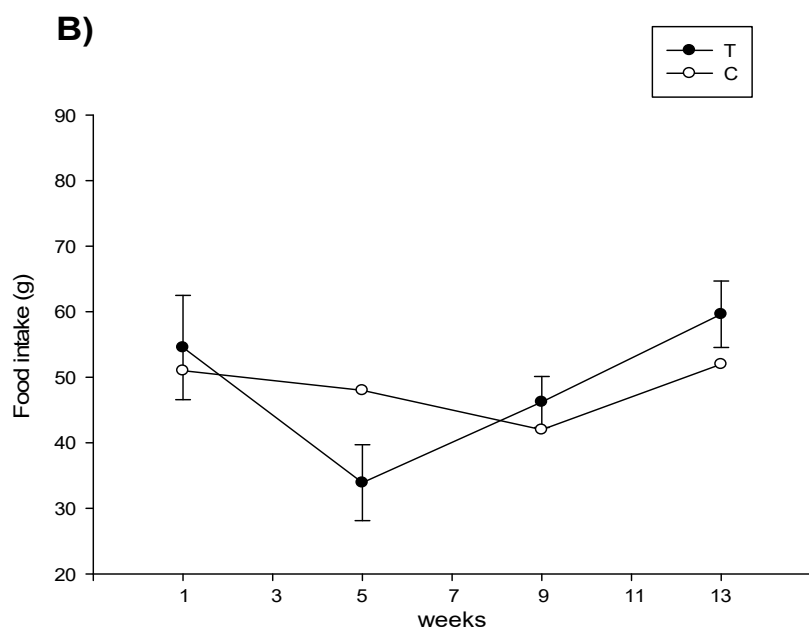
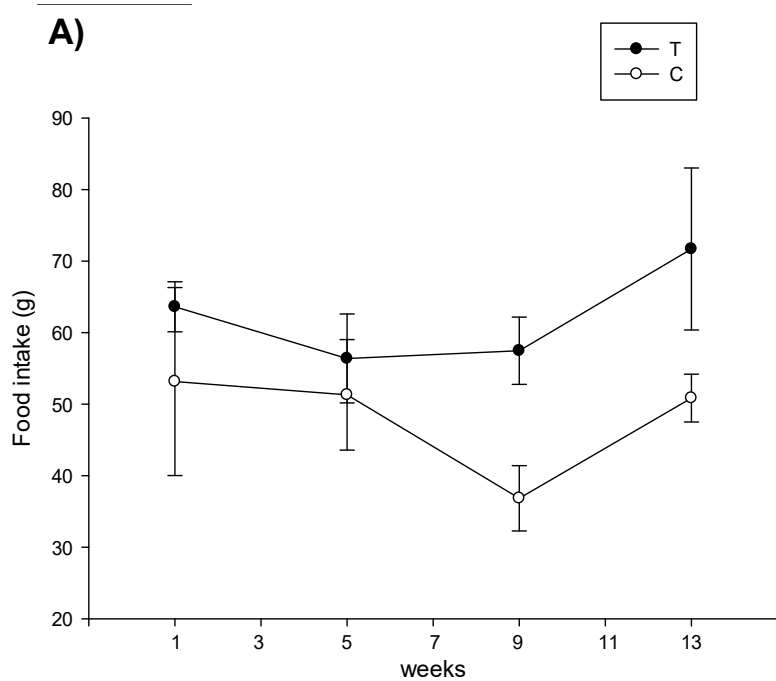


2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

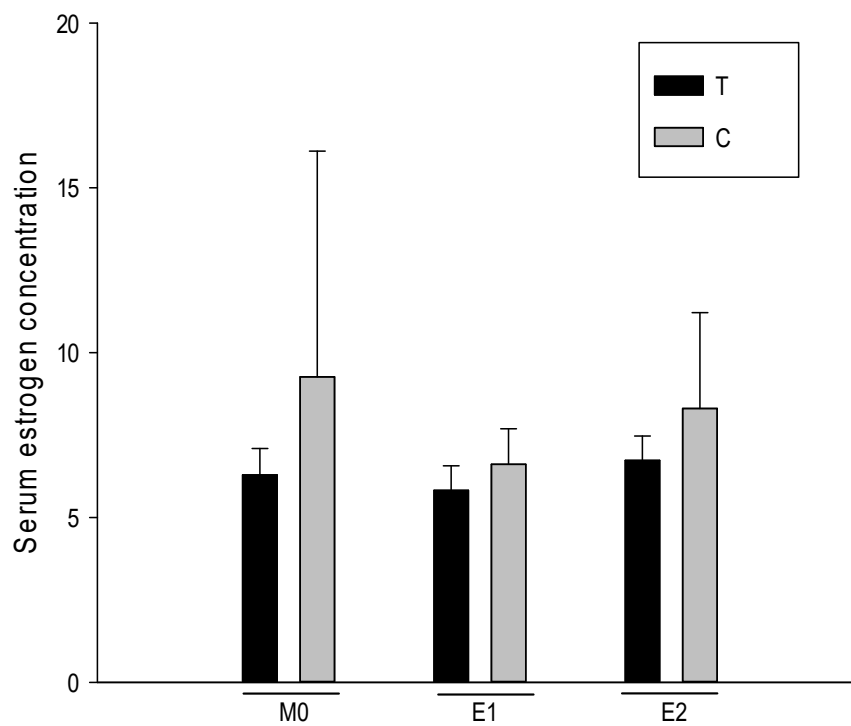
B)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

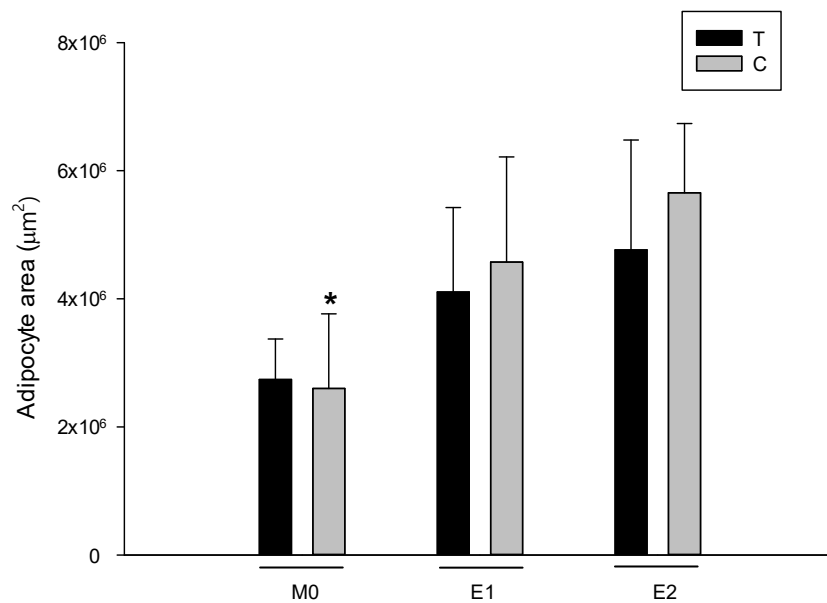


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50



1
2

A)



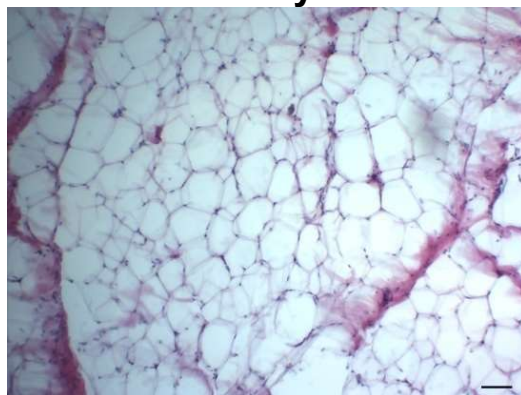
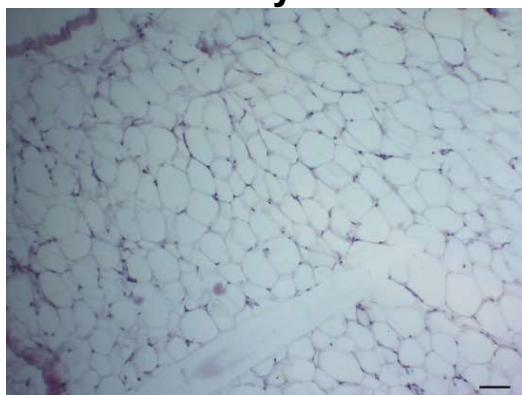
3
4
5
6

B)

Day 30

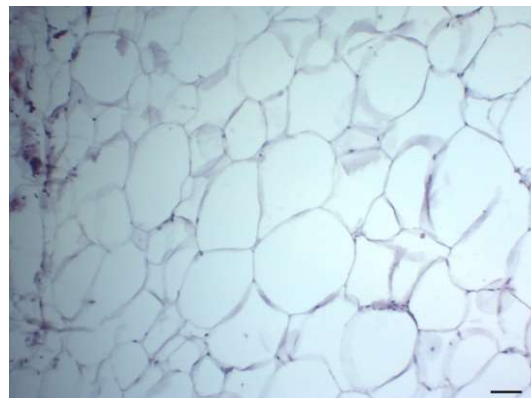
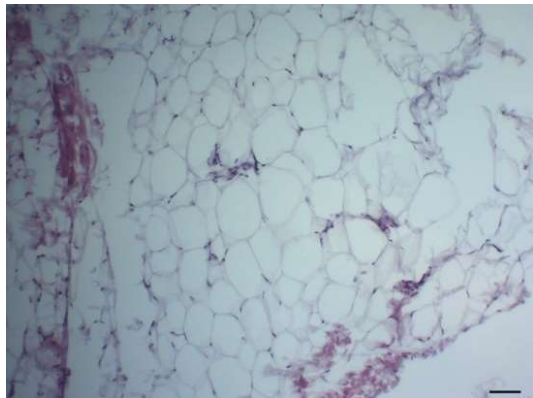
Day 275

T



7
8

C



9
10
11
12
13

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Illustration of the experimental design containing the timeline (in days) of the experimental protocol.

Fig. 2. Weight gain (kg) (A) and food intake (g) (B) of the cats in groups (T and C) in E1, using the 4 μg dose of 17 β -estradiol and in E2, using the 12 μg dose of 17 β -estradiol. Data expressed as mean \pm standard deviation. * $P < 0.05$. T: cats submitted to ovariectomy and supplemented with estrogen; C: cats submitted to ovariectomy. Capital letters represent differences between groups. Lower case letters represent differences between times. Equal letters do not differ significantly ($P > 0.05$) ($n = 8$).

Fig. 3. Linear pattern of the food intake behavior (g) of the cats in groups T and C in E1 (A), using the dose of 4 μg of 17 β -estradiol and in E2 (B), using the 12 μg dose of 17 β -estradiol. T (●). cats submitted to ovariectomy and supplemented with estrogen; C (○). cats undergoing ovariectomy.

Fig. 4. Serum estrogen concentration (pg/mL) of the cats in the groups (T and C) before the experiment (M0), in E1 using the dose of 4 μg of 17 β -estradiol and in E2 using the dose of 12 μg of 17 β -estradiol. Data expressed as mean \pm standard deviation. T: cats submitted to ovariectomy and supplemented with estrogen; C: cats undergoing ovariectomy.

Fig. 5. Adipocyte area in different groups and times. There was a significant increase ($P = 0.030$) of the area in group C between times (A). In (B): photomicrographs (100X magnification) of abdominal subcutaneous adipose tissue stained with hematoxylin-eosin of groups T and C obtained at the beginning (M0) and at the end of the experiment (E2). The images of each group are of the same animal. Note the adipocyte hypertrophy obtained in E2, more pronounced in the animal of group C. T: cats submitted to ovariectomy and supplemented with estrogen; C: cats submitted to ovariectomy. M0: moment before the experiment; E1: experiment 1; E2: experiment 2. Source: personal file.

1 **Introduction**

2 Obesity is the most common nutritional disorder in cats (Lewis; Morris; & Hand; 1994).
3 It is defined as an epidemic disease (Rowe; Browne; Casey; Gruffydd-Jones; & Murray, 2015);
4 chronic and multifactorial complex; difficult to control and treat; due to the positive energy
5 balance that favors the accumulation of fat (Corbee, 2014). Its main endogenous risk factor is
6 castration (Cooke & Naaz, 2004; Teng et al., 2017).

7 In neutered cats, low doses estrogen replacement reduces food intake, body weight and
8 plasma leptin concentrations (Backus, 2011; Cave; Allan; Schokkenbroek; Metekohy; &
9 Pfeiffer, 2012; Wara; Hunsucker; Bove; & Backus, 2015). Additional therapeutic strategies to
10 promote weight loss, including the manipulation of the fecal microbiota, are useful (Fischer et
11 al. 2017), since undesirable changes influence the host's metabolism by one of three
12 mechanisms: increased inflammation due to release of lipopolysaccharides, leading to a
13 condition known as metabolic endotoxemia (Belkaid & Hand, 2014); energy extraction from
14 the diet (Kallus & Brandt, 2012); and alteration of host satiety hormone production, resulting
15 in hyperphagia (Flint, 2011).

16 Studies characterizing the feline fecal microbiota have already been carried out (Deusch
17 et al., 2015; Ritchie; Burke; Garcia-Mazcorro; Steiner; & Suchodolski, 2010), as well as the
18 comparison of the microbiota among lean, obese and neutered cats (Fischer et al., 2017). The
19 aim of this work is to compare the composition of the feline fecal microbiota in three different
20 groups in order to verify the influence of estrogenic replacement in the alteration of the feline
21 fecal microbiota profile.

22

23 **Material and Methods**

24 All the procedures were approved by the Ethical Committee for Animal
25 Experimentation of the State University of Londrina (Protocol Number 5609.2017.46), strictly

1 observing the animal welfare recommendations for the feline species. Twelve healthy short-
2 haired mixed breed adult cats, one to eight years old, with an average of 2.8 kg body weight
3 obtained from adoption shelters were used. Animals were housed together in an enriched room
4 of 22 m², with controlled temperature (22-24°C) and light (12:12 light: dark), free access to
5 water and cat litter. All of them had negative serology for FIV/FeLV tests, and results of
6 hematological and biochemical tests were within reference values. At the end of an
7 environmental, social, nutritional and sanitary 30-day-adaptation period prior to the experiment
8 the animals were divided into three randomized groups: SHAM (control group composed of
9 four animals submitted to celiotomy), OH (four animals submitted to ovariectomy) and
10 OH+E₂ (four animals submitted to ovariectomy receiving 17 β-estradiol).
11 Ovariectomy was performed in accordance with standard procedures in the area of
12 Teriogenology of Companion Animals at the institution. Group OH+E₂ received 17 β-estradiol
13 valerate orally, administered daily for six months, at a dose of 4 μg in the first three months and
14 12 μg in the remaining three months. During the entire experimental period, all animals received
15 the same feed recommended for adult cats (Golden® Premier pets). The nutritional composition
16 provided by the manufacturer was 31% crude protein, 12% ethereal extract, 8% mineral matter,
17 3.5% fibrous matter, 3912 kcal / kg metabolizable energy. The main ingredients used were
18 chicken viscera flour, isolated swine protein, corn gluten bran, ground whole corn, broken rice,
19 beet pulp, chicken fat, fish oil. Individual samples of fresh feces were collected at the end of
20 the experiment, right after defecation, directly from the sandbox and stored at -80°C. The
21 samples were subjected to cell lysis and DNA extraction using the magnetic beads technique
22 with a proprietary protocol (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil). The bacterial
23 identification was performed using high performance sequencing of the V3 / V4 regions of the
24 16S rRNA gene. The sequencing was performed on the MiSeq equipment (Illumina Inc., USA),
25 using the 300 cycle kit V2. The DNA sequences of the microorganisms were analyzed using a

1 proprietary pipeline (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil). The DNA sequences
2 obtained were compared with a database containing other DNA sequences already
3 characterized for the feline species. Bioinformatic analysis was performed with MOTHUR
4 software and loaded on the Neobiome platform for viewing. The taxonomic classification was
5 obtained in the design of the ribosomal database (Cole et al., 2014). The strings were assigned
6 to the phylotypes at the genus level for analysis. The relative abundances were calculated and
7 the main phyla and genera (abundance > 1%) found in each group at different times was
8 presented in a column chart. Alpha and beta diversity analyzes were performed. Richness was
9 estimated by Chao index and diversity by Simpson index. The difference between community
10 members and structure found in each sample was measured by Jackard index, that takes into
11 account the wealth of the community, and Yue & Clayton index, which takes into account
12 diversity (richness and uniformity of the phylotypes present in each sample) (Yue & Clayton,
13 2005). The similarity between community members and the structure present in each sample
14 was represented by two-dimensional analysis of main coordinates (PCoA). The comparison of
15 community members (Jacquard) and structure (Yue & Clayton) between the groups was
16 performed using the Parsimony test and the analysis of molecular variance (AMOVA). The
17 comparison of the relative abundance of all phyla and genera above 1% was performed by one-
18 way ANOVA, considering treatment. The Tukey test was adopted for multiple comparisons
19 considering $P < 0.10$ as statistically significant.

20

21 **Results**

22 All animals remained healthy and without any adverse reaction with estrogen
23 replacement therapy. The OH and OH+E₂ groups had greater weight gain compared to SHAM
24 throughout the experiment (Table 1). There was no difference in serum estrogen concentrations
25 between groups and between times (Table 2). However, with the dose of 12 µg there was weight

1 loss ($P= 0.030$) and appearance of superficial cells without signs of estrus in the colpocytology
2 of the OH+E₂ group, indicating that the dose used was sufficient to cause estrogenic stimulus.
3 There was no difference regarding alpha diversity between groups. The values (mean \pm SD) of
4 Chao, Simpson and Shannon indices in the OH+E₂, OH and SHAM groups were 58.58 ± 13.38 ,
5 10.69 ± 3.51 , 2.74 ± 0.38 ; 48.73 ± 9.06 , 9.73 ± 2.80 , 2.68 ± 0.28 ; 45.30 ± 5.62 , 8.53 ± 3.14 ,
6 2.46 ± 0.32 , respectively. Beta diversity analysis, which assesses the composition and structure
7 of the intestinal microbiota using the Jaccard and Yue & Clayton indices, respectively, are
8 shown in the PCoA graphs in figures 1A and 1B. The statistical analysis performed with the
9 AMOVA test did not reveal any difference between the groups for the Jaccard index ($P= 0.123$),
10 while Yue & Clayton index revealed a statistical difference ($P= 0.094$) in the structure of
11 communities. The dendrogram (figure 2) shows graphically the grouping of similar samples
12 (clusters) and the distance between them. The global averages at phylum level in decreasing
13 order of abundance were: Firmicutes (71%), Actinobacteria (16%), Bacteroidetes (10%),
14 Bacteria unclassified (2%) and Proteobacteria (1%). There was no statistical difference between
15 the groups. There were lower proportions of Firmicutes in the SHAM group, while
16 Bacteroidetes was in lower proportion in the OH+E₂ group compared to the other groups (Table
17 3 and Figure 3). At the gender level, there was a predominance of *Megasphaera*,
18 *Catenibacterium*, *Lachnospiraceae unclassified*, *Collinsella*, *Dialister*, *Holdemanella*,
19 *Bifidobacterium*, *Prevotella* and *Bacteroides*. There was a greater abundance of Firmicutes
20 *Dialister* ($P= 0.020$) in the OH+H₂ group compared to SHAM. There were higher proportions
21 of Firmicutes *Megamonas* and Actinobacteria *Bifidobacterium* in the OH+E₂ group compared
22 to the others, although without statistical difference (Figure 4).

23

24 Discussion

25 Although serum hormonal concentrations between groups of neutered cats were equally

1 low, which may have been due to the short half-life of estrogen (Shille; Haggerty; Shackleton;
2 & Lasley, 1990), estrogen replacement was effective, as it triggered the appearance of
3 superficial cells in colposcopy compared to the OH group and was associated with weight
4 loss in the OH+E₂ group compared to the SHAM group. The five bacterial phyla identified
5 (Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Unclassified, Proteobacteria) are comparable to
6 previous studies in cats regarding the predominance of the phylum Firmicutes over the others
7 (Deusch et al., 2015; Fischer et al., 2017; Ritchie et al., 2010; Ritchie; Steiner; & Suchodolski.
8 2008). However, contrary to these same authors and also to human and rodent models, in which
9 the phylum Bacteroidetes appears in the sequence, this study found the phylum Actinobacteria
10 as the second most abundant. This may be due to the type of diet and are consistent with
11 Bermingham et al. (2013) observations, in which cats fed with dry food containing moderate
12 concentrations of proteins and carbohydrates have a greater abundance of Actinobacteria and
13 less abundance of Fusobacteria and Proteobacteria compared to cats fed with wet food,
14 containing high concentrations of proteins and low concentrations of carbohydrates. Compared
15 with the castrated cats with greater weight gain belonging to the OH and OH+E₂ groups, the
16 cats with less weight gain in the SHAM group had less Firmicutes and more Bacteroidetes,
17 which is in agreement with what is commonly reported for mice and humans (Ley et al., 2006;
18 Turnbaugh et al., 2009), which show an increase in the Firmicutes-Bacteroidetes ratio in
19 obesity. Despite this, it has been sought to understand that the participation of the lower
20 taxonomic levels (families, genera and species) in pathophysiological mechanisms of weight
21 gain may be more relevant than wide changes in the phylum level (Arumugam et al., 2013;
22 Fischer et al., 2017). Studies carried out on mice have established a relationship between fecal
23 microbiota with adiposity (Ley; Turnbaugh; Klein; & Gordon; Jeffrey, 2006), hyperphagia
24 (Raybould; 2012) and sex hormones (Yurkovetskiy et al., 2013). Understanding this
25 interrelation becomes a useful in the prophylaxis and / or treatment of weight gain after

1 castration in the feline species. The limitations of this study include the sample size, which may
 2 have affected the statistical power of the study. However, the results are useful because they
 3 can expand the field of research involving the interrelation of hormonal strategies, microbiota
 4 and obesity in the promotion of feline health.

6 **Acknowledgments**

7 This work had the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino
 8 Superior (CAPES), Brazil.

10 **Declaration of Competing Interest**

11 The authors have nothing to disclose.

13 **References**

- 15 Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D., Le, B., Batto, J., Bertalan, M., ... Huse,
 16 S. M. (2013). Enterotypes in the landscape of gut microbial community
 17 composition. *Nature*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/nature09944>. Enterotypes
 18 Backus, R. (2011). Plasma oestrogen changes in adult male cats after orchietomy,
 19 body-weight gain and low-dosage oestradiol administration. *British Journal of*
 20 *Nutrition*, 106(S1), S15–S18. <https://doi.org/10.1017/s0007114511001796>
 21 Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation.
 22 *Cell*, 157(1), 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
 23 Bermingham, E. N., Young, W., Kittelmann, S., Kerr, K. R., Swanson, K. S., Roy, N.,
 24 C., & Thomas, D. G. (2013). Dietary format alters fecal bacterial populations in the
 25 domestic cat (*Felis catus*). *MicrobiologyOpen*, 2(1), 173–181.
 26 <https://doi.org/10.1002/mbo3.60>
 27 Butera, P. C. (2010). Estradiol and the control of food intake. *Physiology and Behavior*,
 28 99(2), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.06.010>
 29 Cave, N. J., Allan, F. J., Schokkenbroek, S. L., Metekohy, C. A. M., & Pfeiffer, D. U.
 30 (2012). A cross-sectional study to compare changes in the prevalence and risk
 31 factors for feline obesity between 1993 and 2007 in New Zealand. *Preventive*
 32 *Veterinary Medicine*, 107(1–2), 121–133.
 33 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.05.006>
 34 Clegg, D. J., Brown, L. M., Zigman, J. M., Kemp, C. J., Strader, A. D., Benoit, S. C., ...
 35 Geary, N. (2007). Erratum: Estradiol-dependent decrease in the orexigenic
 36 potency of ghrelin in female rats (*Diabetes* (2007) 56 (1051-1058)). *Diabetes*,
 37 56(10), 2649. <https://doi.org/10.2337/db06-0015>. AgRP
 38 Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., ... Tiedje, J. M.
 39 (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA
 40 analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 633–642.
 41 <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
 42 Cooke, P. S., & Naaz, A. (2004). Role of estrogens in adipocyte development and

- 1 function. *Experimental Biology and Medicine*. 229(11). 1127–1135.
2 <https://doi.org/10.1177/153537020422901107>
- 3 Corbee. R. J. (2014). Obesity in show cats. *Journal of Animal Physiology and Animal*
4 *Nutrition*. 98(6). 1075–1080. <https://doi.org/10.1111/jpn.12176>
- 5 Deusch. O.. O'Flynn. C.. Colyer. A.. Swanson. K. S.. Allaway. D.. & Morris. P. (2015).
6 A longitudinal study of the feline faecal microbiome identifies changes into early
7 adulthood irrespective of sexual development. *PLoS ONE*. 10(12). 1–21.
8 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144881>
- 9 Fettman. M. J.. Stanton. C. A.. Banks. L. L.. Hamar. D. W.. Johnson. D. E.. Hegstad.
10 R. L.. & Johnston. S. (1997). Effects of neutering on body weight, metabolic rate
11 and glucose tolerance of domestic cats. *Research in Veterinary Science*. 62(2).
12 131–136. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(97\)90134-X](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(97)90134-X)
- 13 Fischer. M. M.. Kessler. A. M.. Kieffer. D. A.. Knotts. T. A.. Kim. K.. Wei. A.. ... Fascetti.
14 A. J. (2017). Effects of obesity, energy restriction and neutering on the faecal
15 microbiota of cats. *British Journal of Nutrition*. 118(7). 513–524.
16 <https://doi.org/10.1017/S0007114517002379>
- 17 Flint. H. J. (2011). Obesity and the gut microbiota. *Journal of Clinical Gastroenterology*.
18 45(SUPPL. 3). 128–132. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31821f44c4>
- 19 Fukuda. S.. Toh. H.. Hase. K.. Oshima. K.. Nakanishi. Y.. Yoshimura. K.. ... Ohno. H.
20 (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through
21 production of acetate. *Nature*. 469(7331). 543–549.
22 <https://doi.org/10.1038/nature09646>
- 23 Johnston. S. D.. Kustriz. M. V. R.. & Olson. P. N. S. (2001). *Canine and Feline*
24 *Theriogenology* (1^a). Saunders.
- 25 Kallus. S. J.. & Brandt. L. J. (2012). The intestinal microbiota and obesity. *Journal of*
26 *Clinical Gastroenterology*. 46(1). 16–24.
27 <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31823711fd>
- 28 Kanchuk. M. L.. Backus. R. C.. Calvert. C. C.. Morris. J. G.. & Rogers. Q. R. (2003).
29 Weight Gain in Gonadectomized Normal and Lipoprotein Lipase–Deficient Male
30 Domestic Cats Results from Increased Food Intake and Not Decreased Energy
31 Expenditure. *The Journal of Nutrition*. 133(6). 1866–1874.
32 <https://doi.org/10.1093/jn/133.6.1866>
- 33 Kim. Y. S.. & Milner. J. A. (2007). Dietary Modulation of Colon Cancer Risk. *The*
34 *Journal of Nutrition*. 137(11). 2576S–2579S.
35 <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2576s>
- 36 Kozich. J. J.. Westcott. S. L.. Baxter. N. T.. Highlander. S. K.. & Schloss. P. D. (2013).
37 Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for
38 analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform.
39 *Applied and Environmental Microbiology*. 79(17). 5112–5120.
40 <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- 41 Larsen. J. A.. & Villaverde. C. (2016). Scope of the Problem and Perception by Owners
42 and Veterinarians. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*.
43 46(5). 761–772. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.04.001>
- 44 Lewis. L. D.. Morris. M. L.. & Hand. M. S. (1994). Obesity. In *Small Animal Clinical*
45 *Nutrition III* (pp. 1–39). Kansas: Mark Morris Institute.
- 46 Ley. R. E.. Turnbaugh. P. J.. Klein. S.. & Gordon. Jeffrey. I. (2006). Human gut
47 microbes associated with obesity. *Nature*. 444(7122). 1022–1023.
48 <https://doi.org/10.1038/nature4441021a>
- 49 Linder. D.. & Mueller. M. (2014). Pet obesity management: Beyond nutrition. *Veterinary*
50 *Clinics of North America - Small Animal Practice*. 44(4). 789–806.

- 1 <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.03.004>
- 2 Mazmanian. S. K., Round. J. L., & Kasper. D. L. (2008). A microbial symbiosis factor
3 prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*. 453(7195). 620–625.
4 <https://doi.org/10.1038/nature07008>
- 5 Merchenthaler. I., Lane. M. V., Numan. S., & Dellovade. T. L. (2004). Distribution of
6 Estrogen Receptor α and β in the Mouse Central Nervous System: In Vivo
7 Autoradiographic and Immunocytochemical Analyses. *Journal of Comparative*
8 *Neurology*. 473(2). 270–291. <https://doi.org/10.1002/cne.20128>
- 9 Oba. P. M. (2018). *Efeitos Da Parede Celular De Levedura Sobre a Microbiota Fecal*
10 *De Gatos Saudáveis E Naturalmente Infectados Pelo Vírus Da Imunodeficiência*
11 *Felina*.
- 12 Picard. C., Fioramonti. J., François. A., Robinson. T., NEANT. F., & Matuchansky. C.
13 (2005). Bifidobacterias como agentes probióticos: efectos fisiológicos y beneficios
14 clínicos. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 22. 495–512.
- 15 Raybould. H. E. (2012). Gut microbiota, epithelial function and derangements in
16 obesity. *Journal of Physiology*. 590(3). 441–446.
17 <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.222133>
- 18 Ritchie. L. E., Burke. K. F., Garcia-Mazcorro. J. F., Steiner. J. M., & Suchodolski. J. S.
19 (2010). Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene
20 and group-specific primers for Lactobacillus and Bifidobacterium spp. *Veterinary*
21 *Microbiology*. 144(1–2). 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.045>
- 22 Ritchie. L. E., Steiner. J. M., & Suchodolski. J. S. (2008). Assessment of microbial
23 diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. *FEMS*
24 *Microbiology Ecology*. 66(3). 590–598. [https://doi.org/10.1111/j.1574-](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00609.x)
25 [6941.2008.00609.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00609.x)
- 26 Roesch. D. M. (2006). Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake
27 and body weight gain in rats. *Physiology and Behavior*. 87(1). 39–44.
28 <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.035>
- 29 Rogers. N. H., Li. J. W. P., Strissel. K. J., Obin. M. S., & Greenberg. A. S. (2009).
30 Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the
31 development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*. 150(5). 2161–2168.
32 <https://doi.org/10.1210/en.2008-1405>
- 33 Rowe. E., Browne. W., Casey. R., Gruffydd-Jones. T., & Murray. J. (2015). Risk factors
34 identified for owner-reported feline obesity at around one year of age: Dry diet and
35 indoor lifestyle. *Preventive Veterinary Medicine*. 121(3–4). 273–281.
36 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.07.011>
- 37 Shille. V. M., Haggerty. M. A., Shackleton. C., & Lasley. B. L. (1990). Metabolites of
38 estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*).
39 *Theriogenology*. 34(4). 779–794. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90032-O](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90032-O)
- 40 Shin. J. H., Sim. M., Lee. J. Y., & Shin. D. M. (2016). Lifestyle and geographic insights
41 into the distinct gut microbiota in elderly women from two different geographic
42 locations. *Journal of Physiological Anthropology*. 35(1). 1–9.
43 <https://doi.org/10.1186/s40101-016-0121-7>
- 44 Silva. L. E. C. M., Castro. M., Amaral. F. C., Antunes-Rodrigues. J., & Elias. L. L. K.
45 (2010). Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA
46 expression of hypothalamic neuropeptides. *Brazilian Journal of Medical and*
47 *Biological Research*. 43(8). 759–766. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500059)
48 [879X2010007500059](https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500059)
- 49 Smith. C. J., Rocha. E. R., & Paster. B. J. (2006). The medically important *Bacteroides*
50 spp. in health and disease. *The Prokaryotes*. 7. 381–427.

- 1 Teng. K. T.. McGreevy. P. D.. Toribio. J. A. L. M. L.. Raubenheimer. D.. Kendall. K.. &
2 Dhand. N. K. (2017). Risk factors for underweight and overweight in cats in
3 metropolitan Sydney, Australia. *Preventive Veterinary Medicine*. 144. 102–111.
4 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.05.021>
- 5 Turnbaugh. P. J.. Hamady. M.. Yatsunenkov. T.. Cantarel. B. L.. Duncan. A.. Ley. R. E..
6 ... Gordon. J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*.
7 457(7228). 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- 8 Wara. A.. Hunsucker. S.. Bove. K.. & Backus. R. (2015). Short-term estrogen
9 replacement effects on insulin sensitivity and glucose tolerance in at-risk cats for
10 feline diabetes mellitus. *PLoS ONE*. 10(6). 1–16.
11 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130696>
- 12 Wei. A.. Fascetti. A. J.. Kim. K.. & Ramsey. J. J. (2014). Post-castration variations in
13 weight gain in a cohort of young adult male cats. *Journal of Nutritional Science*. 3.
14 1–4. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.37>
- 15 Wen. L.. Ley. R. E.. Volchkov. P. Y.. Stranges. P. B.. Avanesyan. L.. Stonebraker. A.
16 C.. ... Chervonsky. A. V. (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the
17 development of Type 1 diabetes. *Nature*. 455(7216). 1109–1113.
18 <https://doi.org/10.1038/nature07336>
- 19 Wong. J. M. W.. De Souza. R.. Kendall. C. W. C.. Emam. A.. & Jenkins. D. J. A. (2006).
20 Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical*
21 *Gastroenterology*. 40(3). 235–243. [https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-](https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015)
22 00015
- 23 Yue. J. C.. & Clayton. M. K. (2005). A similarity measure based on species proportions.
24 *Communications in Statistics - Theory and Methods*. 34(11). 2123–2131.
25 <https://doi.org/10.1080/STA-200066418>
- 26 Yurkovetskiy. L.. Burrows. M.. Khan. A. A.. Graham. L.. Volchkov. P.. Becker. L.. ...
27 Chervonsky. A. V. (2013). Gender bias in autoimmunity is influenced by
28 microbiota. *Immunity*. 39(2). 400–412.
29 <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.013>
- 30 Zhang. X.. Shen. D.. Fang. Z.. Jie. Z.. Qiu. X.. Zhang. C.. ... Ji. L. (2013). Human Gut
31 Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS ONE*.
32 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>

33
34
35
36
37
38
39
40

1

2 **Table 1** - Values of food intake (FI) (g) and weight gain (WG) (kg) of the cats (in kg) in the groups (OH+E₂, OH and SHAM), in the period prior to the
3 experiment (M0) and using doses of 4 µg and 12 µg. Data expressed as mean ± standard deviation.

GROUPS	MO		4µg		12µg		TOTAL	
	FI	WG	FI	WG	FI	WG	FI	WG
OH+E ₂	64.00±6.83 ^{Aa}	0.31±0.11 ^{Abb}	62.28±7.03 ^{Ba}	0.66±0.21 ^{Aa}	48.57±11.22 ^{Ab}	-0.10±0.21 ^{Ac}	58.28±10.60	0.29±0.36
OH	54.75±15.06 ^{Aa}	0.43±0.19 ^{Aa}	48.03±7.53 ^{Aa}	0.55±0.25 ^{Aa}	49.98±7.52 ^{Aa}	0.10±0.09 ^{ABb}	50.92±10.07	0.36±0.26
SHAM	63.25±5.12 ^{Aa}	0.10±0.06 ^{Ba}	55.84±3.79 ^{Aa}	0.07±0.21 ^{Ba}	44.52±1.75 ^{Ab}	0.18±0.06 ^{Ba}	54.53±8.75	0.12±0.13
TOTAL	60.66±10.04	0.28±0.18	55.38±8.36	0.43±0.34	47.68±7.51	0.06±0.18		

4 OH+E₂ - cats undergoing ovariectomy and then supplemented with estrogen, OH - cats undergoing ovariectomy, SHAM-cats undergoing
5 celiotomy.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

1
2 **Table 2** - Serum estrogen values (pg/mL), by the radioimmunoassay technique, of the cats in the groups (OH+E₂, OH and SHAM) before the
3 experiment and receiving estrogen replacement with 17 β-estradiol at a dose of 4 μg (E1) and 12 μg (E2). Data expressed as mean ± standard
4 deviation.
5

GROUPS	M0	4μg	12μg
OH+E ₂	6.70 (5.64-6.89) ^{Aa}	5.82 ± 0.74 ^{Aa}	6.73 ± 0.73 ^{Aa}
OH	6.63 (5.66-9.88) ^{Aa}	6.61 ± 1.07 ^{Aa}	8.30 ± 2.90 ^{Aa}
SHAM	7.99 (5.86-9.73) ^{Aa}	6.65 ± 0.70 ^{Aa}	6.89 ± 0.73 ^{Aa}

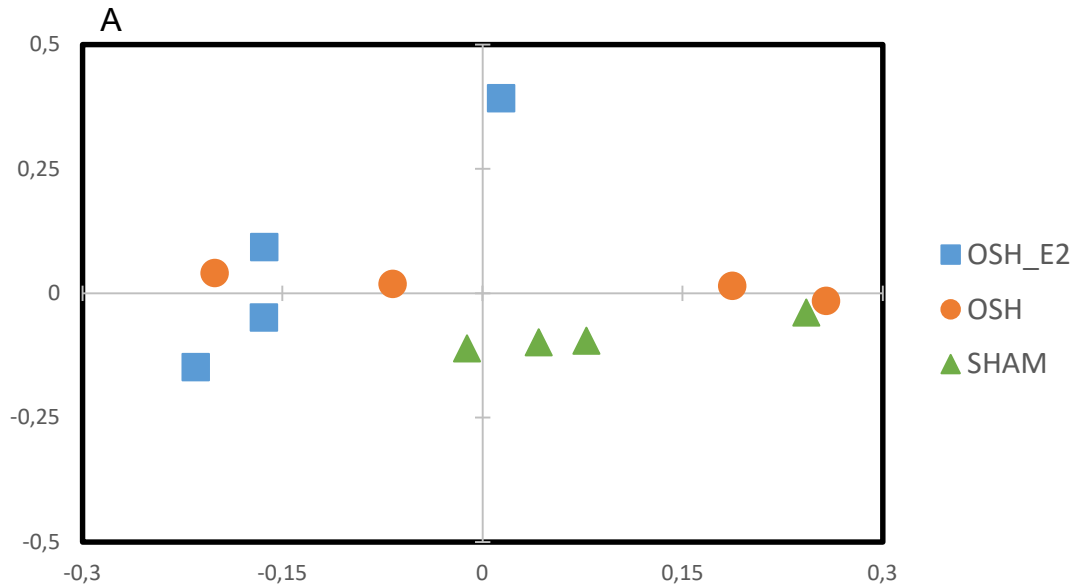
6 OH + E2 - cats undergoing ovariectomy and then supplemented with estrogen, OH - cats undergoing ovariectomy, SHAM-cats
7 undergoing celiotomy.

1 **Table 3** - Classification and species richness of the fecal microbiota in three groups of cats
 2 (OH+E₂, OH and SHAM), expressed as a percentage, at the phylum level.

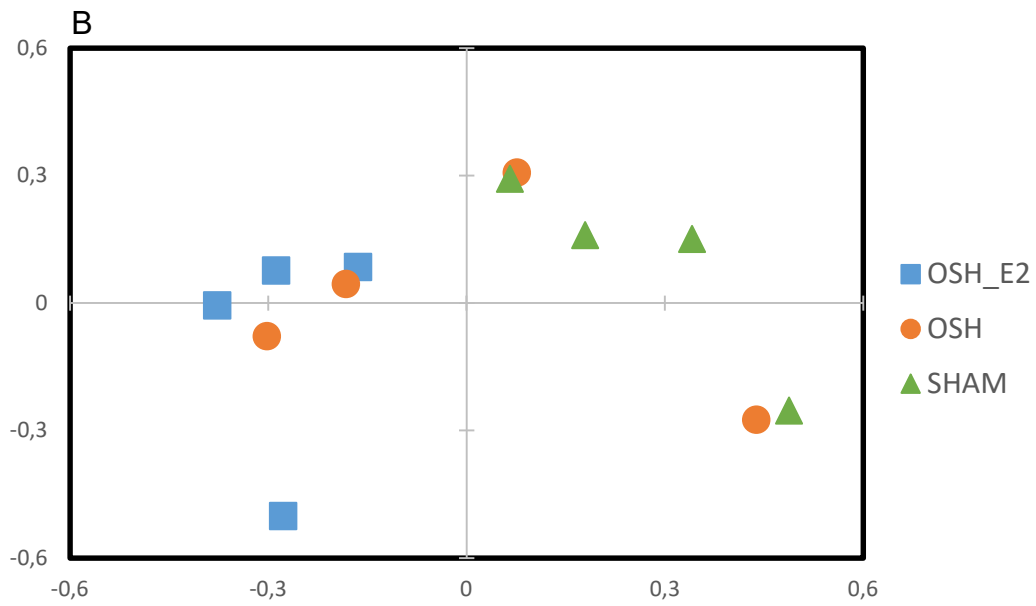
	Firmicutes	Actinobacteria	Bacteroidetes	Unclassified	Proteobacteria
Cat 1 OH+E ₂	61	20	15	2	2
Cat 2 OH+E ₂	75	10	12	2	2
Cat 3 OH+E ₂	62	35	0	3	0
Cat 4 OH+E ₂	88	09	1	1	0
Mean (sd)	71 (0.13)	19 (0.12)	7 (0.07)	2 (0.00)	1 (0.01)
Cat 1 OH	67	23	5	4	0
Cat 2 OH	54	4	36	3	1
Cat 3 OH	93	4	2	1	0
Cat 4 OH	76	20	1	3	0
Mean (sd)	74 (0.16)	9 (0.10)	13 (0.16)	2 (0.01)	0 (0)
Cat 1 SHAM	55	23	12	4	5
Cat 2 SHAM	40	20	37	0	1
Cat 3 SHAM	85	12	1	1	0
Cat 4 SHAM	88	8	1	3	0
Mean (sd)	67 (0.23)	16 (0.07)	13 (0.17)	2 (0.01)	2 (0.02)

3 OH+E₂ - cats submitted to ovariectomy and then supplemented with estrogen, OH - cats submitted to
 4 ovariectomy, SHAM- cats submitted to celiotomy.
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34

1 **Figure 1** – Principal component analysis chart (PCoA) representing the fecal microbial
2 communities of cats in the OH+E₂, OH and SHAM groups in terms of composition (Jaccard),
3 in A, and structure (Yue & Clayton), in B.
4



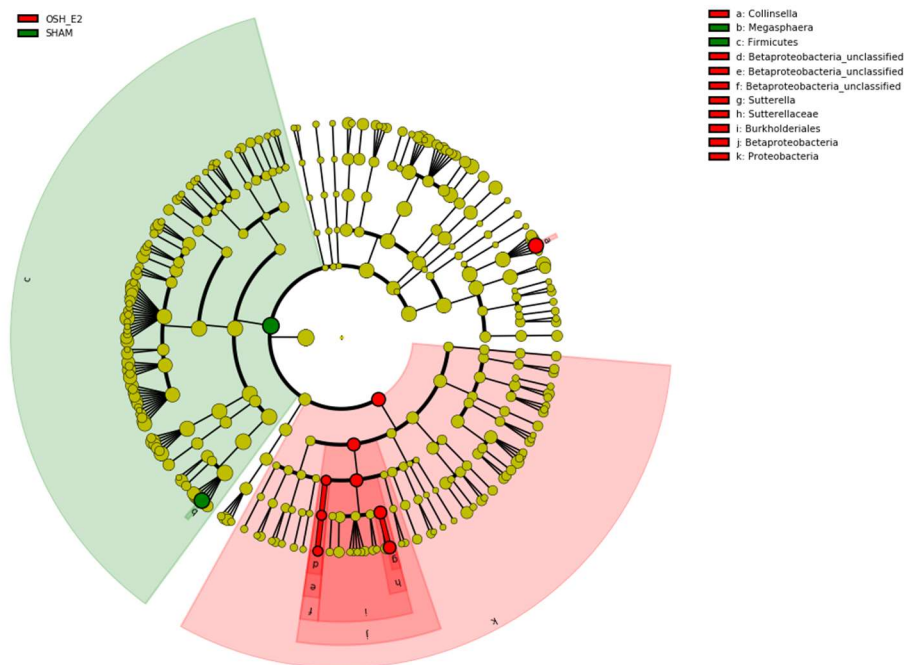
5
6
7



8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

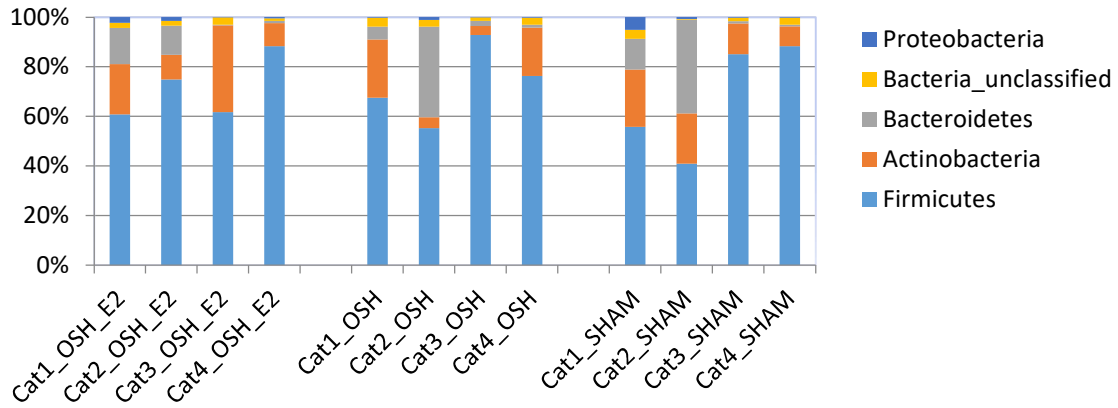
OH+E₂ - cats undergoing ovariectomy and then supplemented with estrogen, OH - cats undergoing ovariectomy, SHAM-cats undergoing celiotomy.

1 **Figure 2** – Dendrogram representing the distance between faecal samples from cats receiving
 2 estrogenic replacement (OH+E₂) and control cats (SHAM).



3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29

1 **Figura 3** – General percentage distribution of the bacterial population, at phylum level, present
 2 in the feces of three groups of cats (OH+E₂, OH and SHAM).



3

4 OH+E₂ - cats submitted to ovariectomy and then supplemented with estrogen, OH - cats submitted to
 5 ovariectomy, SHAM- cats submitted to celiotomy.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

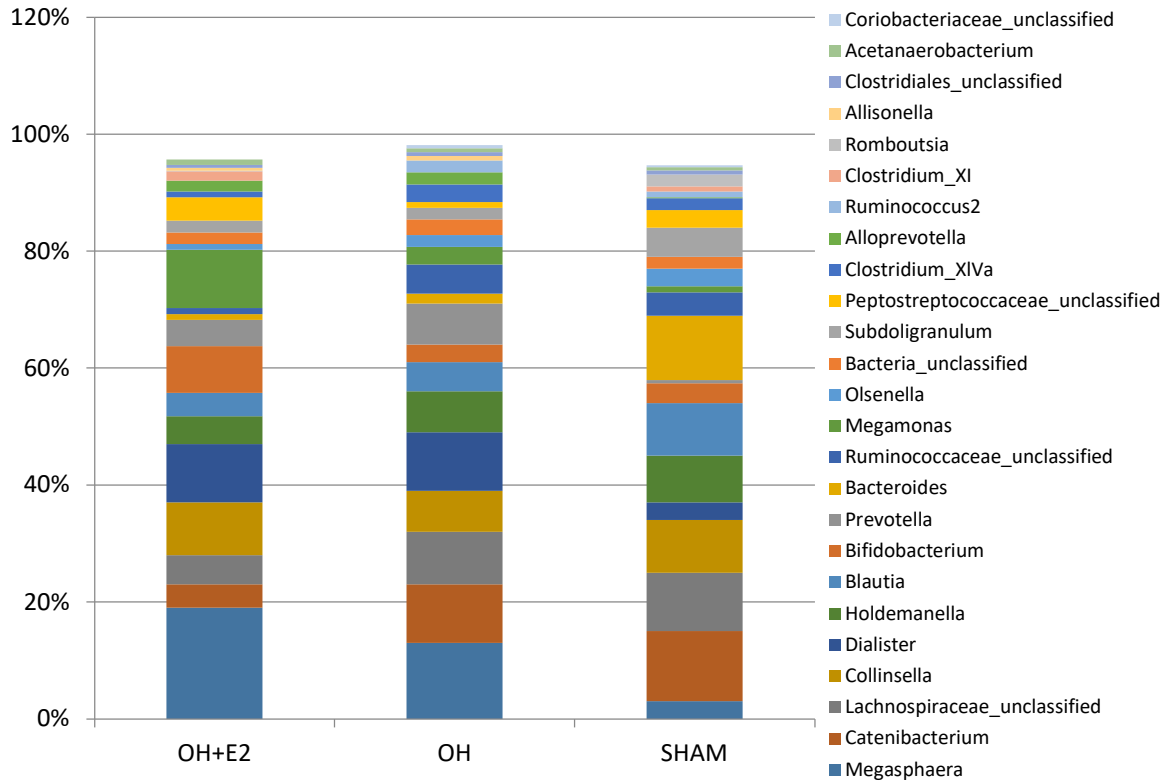
19

20

21

22

1 **Figure 4** – General percentage values of bacterial populations present in feces, at the gender
 2 level, in three groups of cats (OH+E₂, OH and SHAM).



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A castração tem sido encorajada nas últimas décadas para o controle da natalidade e para a longevidade do animal. Hoje em dia, contudo, tem sido especulado e comprovado os efeitos deletérios tardios da ausência das gônadas e seus respectivos hormônios na fisiologia do animal. A reposição estrogênica, muito estudada em mulheres, pode ser uma alternativa útil para contrapor os efeitos da castração sobre a homeostasia, desde que em dose segura e isenta de efeitos adversos.

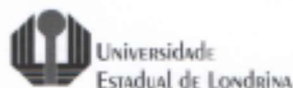
O emprego da dose 4 µg de valerato de 17 β- estradiol por via oral durante 90 dias apresentou efeito subfisiológico. Já o emprego da dose de 12 µg, também por 90 dias, mostrou-se segura e efetiva na perda de peso, atribuída a um maior gasto energético. Esta dose também proporcionou uma menor hipertrofia adipocitária quando comparada ao grupo sem reposição. Além disso, as enzimas hepáticas, os triglicerídeos e o colesterol mostraram-se em menores proporções quando comparados ao grupo sem reposição, o que é compatível com um estado de maior proteção à síndrome metabólica.

Com relação à microbiota fecal, não houve diferenças na alfa diversidade entre os três diferentes grupos analisados. A reposição estrogênica não alterou a relação Firmicutes/Bacteroidetes e a promoção de um fenótipo mais magro. A beta diversidade, porém, evidenciou uma diferença quanto à estrutura e composição das comunidades entre os grupos.

Como perspectivas futuras, espera-se que o emprego de doses seguras de estrógenos ou fitoestrógenos possam ser mais bem explorados após a castração, inclusive adicionadas à ração, podendo trazer resultados benéficos como estratégia de prevenção à obesidade felina e suas comorbidades.

ANEXO A

Autorização da Comissão de Ética no uso de animais para a realização do experimento



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 54/2017

Londrina, 02 de Maio de 2017.

Prezada Profª.

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação Bioquímica, hormonal, histológica, e citométrica da obesidade em gatas ovariectomizadas submetidas à reposição estrogênica" protocolo CEUA nº5609.2017.46, sob a responsabilidade de Maria Isabel de Melo Martins, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em 11/04/2017.

O Objetivo do projeto é comparar o ganho de peso após a castração nos diferentes grupos testados e identificar o melhor protocolo pós cirúrgico de prevenção da obesidade e da síndrome metabólica decorrente de alterações lipídicas e da resistência insulínica após a cirurgia entre os grupos. Grau de invasividade= 3

Vigência do Projeto	01/01/2018 a 31/12/2018
Espécie/inhagem	S.R.D / Gato
Nº de animais	32
Peso/Idade	1 ano/ 3,5kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Proprietários particulares
Amostras a serem coletadas	Sangue, Tecido adiposo subcutâneo

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Profª. Dra. Gláucia Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilma. Sra.
Profª. Dra. Maria Isabel de Melo Martins
Responsável pelo projeto
Departamento de Clínica Veterinária/CCA
C/C Clínica Veterinária/CCA
C/C Diretor do Centro de Ciências Agrárias/ CCA/

ANEXO B

Resultado de Sorologia para Pesquisa de *Toxoplasma gondii* nos animais que fizeram parte do experimento



Universidade Estadual de Londrina

**HOSPITAL VETERINÁRIO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
LABORATÓRIO DE ZOONOSES E SAÚDE PÚBLICA**

SOROLOGIA PESQUISA DE IGG: *Toxoplasma gondii*

R.G.	
P.P.	

Proprietário	Jamile Haddad Neta				
Propriedade	-				
Município/UF	Londrina/PR				
Material colhido por	-			Idade	-
Espécie animal	Felina	Raça	-	Sero	-
Ident. do animal	-	Data/ colheita	-	Data /exame	29/09/17
Ident. do material	Soro			Nº/amostras	15

RESULTADO		
Ident. do animal	Métodos Utilizados	Resultados
Borradinha	RIFI	16
Pretinha	RIFI	NEGATIVO
Vamp	RIFI	64
Rajadinha	RIFI	NEGATIVO
Siamesa da Karen	RIFI	256
Cinzinha	RIFI	256
Bolinha	RIFI	NEGATIVO
Evril	RIFI	256
Kiki	RIFI	NEGATIVO
Frida	RIFI	16
Amry	RIFI	NEGATIVO
Floquinha	RIFI	16
Pretella	RIFI	NEGATIVO
Lilith	RIFI	NEGATIVO
Gifi	RIFI	NEGATIVO

RIFI- Reação de Imunofluorescência Indireta (reagente ≥ 16)

Londrina, 30 de Setembro de 2017 .

Prof. Dra. Roberta Leanos Freire
CRMV-PR 2208