

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

Perfil metabólico e avaliação radiográfica de potros Mangalarga Marchador  
recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e sal mineralizado corrigido  
com diferentes relações de Ca:P

DÉBORA ROQUE DE FREITAS ANDRADE

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2022

DÉBORA ROQUE DE FREITAS ANDRADE

Perfil metabólico e avaliação radiográfica de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e sal mineralizado corrigido com diferentes relações de Ca:P

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Nutrição Animal/Não Ruminantes

Orientadora: Adalgiza S. Carneiro de Rezende

Coorientadora: Raquel Silva Moura

Coorientador: Alviclér Magalhães

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2022

A554p

Andrade, Débora Roque de Freitas, 1992-  
Perfil metabólico e avaliação radiográfica de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca: oxalato e sal mineralizado corrigido com diferentes relações de Ca:P / Débora Roque de Freitas Andrade. – 2022.  
54 f: il.

Orientadora: Adalgiza Souza Carneiro

Coorientadores: Raquel Silva Moura

Alviclér Magalhães

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Produção de não-ruminantes

Bibliografia: f. 51 a 53.

1. Mangalarga - Cavalo - Teses - 2. Equino - Teses - 3. Dieta em Veterinária – Teses – I. Carneiro, Adalgiza Souza- II. Moura, Raquel Silva – III. Magalhães, Alviclér – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

**CDD – 636.089**

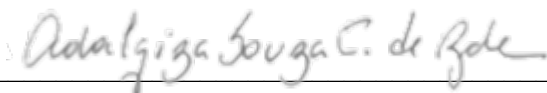
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

## FOLHA DE APROVAÇÃO

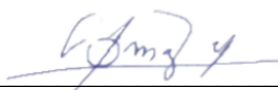
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia, área de concentração Nutrição Animal.

Aprovada em 31 de março de 2022 pela banca constituída pelos membros:



---

Profa. Adalgiza Souza Carneiro de Rezende  
(Orientadora)



---

Prof. Alviclér Magalhães



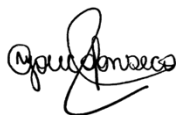
---

Prof. Walter Motta Ferreira



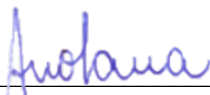
---

Prof. Juliano Martins Santiago



---

Profa. Mayara Gonçalves Fonseca



---

Prof. Ângela Maria Quintão Lana

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2022

**Dedicatória,**

*Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.  
A Ele seja a glória para sempre! Amém.*

*Romanos 11.36*

## Agradecimentos

À Deus, toda honra e toda glória, pois sem Ele nada disso teria acontecido. Sei que foi Ele que me colocou nesse caminho e sonhou este sonho para mim.

Ao meu marido Rafael e às minhas filhas Manuela e Alice, por sempre me apoiarem e entenderem os momentos ausentes.

À minha mãe e ao meu pai, por sempre me apoiarem em todos os meus sonhos e lutarem junto comigo desde pequena.

À Professora Adalgiza, por seu exemplo de amor aos cavalos, pela dedicação a todos nós, pelas oportunidades e confiança.

À Professora Raquel Moura pela orientação e colaboração na execução da pesquisa

Ao Professor Alvicler Magalhães, por ter me acolhido no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela recepção, apoio e por ter me apresentado ao maravilhoso universo da metabolômica.

pela contribuição durante todos os momentos deste trabalho e por me receber tão bem em seu laboratório.

A profa Marília e Fabíola por terem disponibilizado o laboratório e sua equipe para as análises.

À Fabiana, Dayanne e Felipe da UFLA.

Ao Núcleo Mangalarga Marchador do Alto Rio Grande e ao Haras Elfar.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelas bolsas que permitiram a realização deste trabalho. Em especial à FAPEMIG pelo financiamento da etapa experimental.

E principalmente aos cavalos que nos ajudaram e trabalharam duro. Sem eles este trabalho nunca poderia ser realizado.

MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

Potros alimentados com dietas deficientes em cálcio no primeiro ano de vida podem apresentar debilidades estruturais e distúrbios metabólicos que, conseqüentemente, depreciam seu valor econômico e futuro desempenho atlético. O *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) é uma forrageira adaptada às condições edafoclimáticas do Brasil, utilizada na alimentação dos equídeos principalmente durante o período de seca. Essa gramínea apresenta altas concentrações de oxalato, o qual pode formar composto insolúvel com o cálcio (Ca) dietético, reduzindo sua absorção, predispondo os animais ao hiperparatireoidismo nutricional secundário. Este estudo teve por objetivo verificar se o consumo do capim elefante como única fonte forrageira, sal mineral *ad libitum* e concentrado suplementar com diferentes relações entre Ca e P afeta o metabolismo desses minerais em potros desmamados. Foram utilizados 16 potros machos, Mangalarga Marchador, entre 5 e 10 meses, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos diferenciados pela relação Ca:P do concentrado suplementar que foi fornecido diariamente (2:1; 3:1; 5:1; 6:1). Foram realizadas quatro coletas de amostras sanguíneas para avaliar Ca, P, magnésio (Mg), paratormônio (PTH), gamaglutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) e análise metabolômica. Análise metabolômica foi realizada para verificar o perfil metabólico no soro dos animais, o que resultou em 22 metabólitos. Imagens radiográficas também foram feitas para verificar a ocorrência de deformidade angular e o índice cortical. As coletas foram feitas aos 0, 15, 43 e 71 dias após o fornecimento das dietas experimentais. Houve redução ( $p < 0,05$ ) do Ca sérico ao longo do tempo em todos os tratamentos, assim como aumento da concentração de PTH. Além disso, o P foi maior aos 43 dias após o fornecimento, estando maior que os valores referência. Na comparação entre a intensidade dos espectros, observaram-se aumentos dos metabólitos 3-hidroxiacetato, acetona, valina, isoleucina, leucina, creatina, fosfocreatina, creatinina, dimetil sulfona, glicose, piruvato, glicerol, N-acetilglicosamina, propionato, lactato, acetato, glicolato e taurina. Dos metabólitos que apresentaram redução na intensidade dos espectros têm-se a alanina, treonina e metionina. A análise de  $^1\text{H}$  RMN demonstrou alta reprodutibilidade entre as amostras. A identificação dos 22 metabólitos presentes no soro de potros recebendo gramínea rica em oxalato como única fonte forrageira vem somar aos conhecimentos já estabelecidos para o HNS, auxiliando para o melhor entendimento do cenário presente nesta doença.

**Palavras-chave:** equinos em crescimento, forrageiras tropicais, nutrição animal, oxalato, hiperparatireoidismo

## **ABSTRACT**

Foals fed calcium-deficient diets in the first year of life may have structural weaknesses and metabolic disorders that, consequently, detract from their economic value and future athletic performance. *Pennisetum purpureum* (elephant grass) is a forage adapted to the edaphoclimatic conditions in Brazil, used to feed equines mainly during the dry season. This grass has high concentrations of oxalate, which can form an insoluble compound with dietary calcium (Ca), reducing its absorption, predisposing animals to secondary nutritional hyperparathyroidism. This study aimed to verify whether the consumption of elephant grass as the only forage source, mineral salt *ad libitum* and supplementary concentrate with different ratios between Ca and P affects the metabolism of these minerals in weaned foals. Sixteen male foals, Mangalarga Marchador, aged between 5 and 10 months, were randomly divided into 4 groups differentiated by the Ca:P ratio of the supplementary concentrate that was supplied daily (2:1; 3:1; 5:1; 6:1). Four blood samples were collected to evaluate Ca, P, magnesium (Mg), parathyroid hormone (PTH), gamma-glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (FA) and metabolomic analysis. Metabolomic analysis was performed to verify the metabolic profile in the serum of the animals, which resulted in 22 metabolites. Radiographic images were also taken to verify the occurrence of angular deformity and the cortical index. Collections were made at 0, 15, 43 and 71 days after the provision of experimental diets. There was a reduction ( $p < 0.05$ ) in serum Ca over time in all treatments, as well as an increase in PTH concentration. In addition, P was higher at 43 days after supply, being higher than the reference values. Comparing the intensity of the spectra, increases were observed in the metabolites 3-hydroxybutyrate, acetone, valine, isoleucine, leucine, creatine, phosphocreatine, creatinine, dimethyl sulfone, glucose, pyruvate, glycerol, N-acetylglucosamine, propionate, lactate, acetate, glycolate and taurine. Of the metabolites that showed a reduction in the intensity of the spectra are alanine, threonine and methionine. The  $^1\text{H}$  NMR analysis demonstrated high reproducibility between samples. The identification of the 22 metabolites in the serum of foals receiving oxalate-rich grass as the only forage source adds to the knowledge already established for the HNS, helping to better understand the scenario present in this disease.

**Keywords:** growing horses, tropical forages, animal nutrition, oxalate, hyperparathyroidism

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama demonstrando a complexidade e interligação entre as vias e reações metabólicas dos organismos..... 24
- Figura 2. Representação da cascata das abordagens “ômicas”..... 26
- Figura 3. Espectro  $^1\text{H}$  geral de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P, com a identificação dos metabólitos presentes no soro..... 45
- Figura 4. Gráfico de pesos para as variáveis fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT), cálcio, magnésio, fósforo, paratormônio (PTH), calcitonina, índice cortical, ângulo pivô, densidade óssea, peso vivo (PV), 3-hidroxi-butirato, acetato, acetona, alanina, glicose, lactato, valina, isoleucina, leucina, creatina, creatinina, fosfocreatina, treonina, glicolato, glicerol, taurina, dimetilsulfona, formato, metionina, piruvato, propionato e N-acetilglicosamina que mais contribuíram para a variabilidade dos espectros de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P..... 47
- Figura 5. Mapa perceptual das variáveis (fosfatase alcalina, gama-glutamilttransferase, cálcio, magnésio, fósforo, paratormônio, calcitonina, índice cortical, ângulo pivô, densidade óssea, peso vivo, 3-hidroxi-butirato, acetato, acetona, alanina, glicose, lactato, valina, isoleucina, leucina, creatina, creatinina, fosfocreatina, treonina, glicolato, glicerol, taurina, dimetilsulfona, formato, metionina, piruvato, propionato e N-acetilglicosamina) na primeira e segunda dimensão à esquerda e na terceira e na quarta dimensão à direita..... 48
- Figura 6. Concentrações séricas de 3-hidroxi-butirato, acetona, valina, isoleucina, leucina, creatina, N-acetilglicosamina, propionato, piruvato, formato, dimetil sulfona, glicerol, glicolato, fosfocreatina e creatinina obtidas por meio de  $^1\text{H}$  RMN aos 0, 15, 43 e 71 dias de fornecimento de gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P..... 49
-

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de Cálcio, Fósforo, Oxalato total e razão Cálcio/ Oxalato na matéria seca das folhas de gramíneas tropicais.....	16
Tabela 2. Caracterização dos grupos experimentais e composição de Cálcio, oxalato, relação Cálcio:Fósforo e Cálcio:oxalato das dietas experimentais Formulação dos concentrados experimentais.....	38
Tabela 3. Matéria seca da proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), cálcio (Ca), fósforo (P) e oxalato, do concentrados suplementares e feno de Tifton ( <i>Cynodon sp.</i> ) fornecidos no período pré-experimental.....	39
Tabela 4. Média das concentrações séricas de cálcio, fósforo, paratormônio, magnésio, gama-glutamilttransferase e fosfatase alcalina, além do ângulo da deformidade e índice cortical de potros Mangalarga Marchador alimentados com capim-elefante e concentrados com diferentes relações entre Ca:P no período após a desmama aos 0, 15, 43 e 71 dias de fornecimento da dieta.....	42
Tabela 5. Metabólitos e seus respectivos deslocamentos químicos comuns ao soro de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e sal mineralizado corrigido com diferentes relações de Ca:P.....	46

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ca:P Relação cálcio e fósforo

Ca Cálcio

DA Deformidade angular

EB Energia bruta

FA Fosfatase alcalina

FDA Fibra insolúvel em detergente neutro

FDN Fibra insolúvel em detergente ácido

GGT gamaglutamiltransferase

HNS Hiperparatireoidismo nutricional secundário

<sup>1</sup>H RMN Ressonância magnética nuclear de prótons de hidrogênio

IC Índice cortical

MM Matéria mineral

Mg Magnésio

OCD Osteocondrite dissecante

P Fósforo

PB Proteína bruta

PCA – (Principal Component Analysis) Análise da Componente Principal

ppm – Partes por milhão

PTH Paratormônio

PV Peso vivo

Vit D Vitamina D

---

## SUMÁRIO

<b><i>INTRODUÇÃO</i></b> .....	<b>13</b>
<b><i>CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i></b> .....	<b>14</b>
<b>1.1. A equideocultura no Brasil</b> .....	<b>14</b>
1.1.1. A importância da nutrição do potro .....	15
<b>1.2. A importância da forrageira na nutrição equina</b> .....	<b>15</b>
1.2.1. Uso do capim elefante na alimentação equina .....	17
<b>1.3. Hiperparatireoidismo nutricional secundário</b> .....	<b>18</b>
1.3.1. Parâmetros bioquímicos.....	20
1.3.2. Avaliações radiográficas .....	23
1.3.3. Análise metabólica.....	24
<b>1.4. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>29</b>
<b><i>CAPÍTULO II - PERFIL METABÓLICO E AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE POTROS MANGALARGA MARCHADOR RECEBENDO GRAMÍNEA COM BAIXA RELAÇÃO CA:OXALATO E CONCENTRADO COM DIFERENTES RELAÇÕES DE CA:P</i></b> .....	<b>35</b>
<b>2.1. RESUMO</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2. ABSTRACT</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>2.4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>2.6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>51</b>
<b><i>ANEXOS</i></b> .....	<b>55</b>
<b>ANEXO I - Formulação dos concentrados experimentais</b> .....	<b>55</b>
<b>ANEXO II – Radiografias de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P</b> .....	<b>55</b>

## INTRODUÇÃO

Os equinos são naturalmente animais atletas e são utilizados tanto para o trabalho, como manejo do gado, quanto no esporte, atividades que demandam uma estrutura osteomuscular forte. A nutrição é fundamental para o perfeito funcionamento e desenvolvimento ósseo e muscular. Desse modo, alimentação e manejos adequados resultam em maior longevidade, eficiência no trabalho e melhor desempenho reprodutivo nessa espécie (Gollcher et al., 2010). Como são animais herbívoros não ruminantes, a base de sua alimentação são as forrageiras oferecidas na forma fresca ou conservadas, correspondendo a mais de 50% da matéria seca da dieta.

Os equinos possuem acelerado desenvolvimento no seu primeiro ano de vida, atingindo 90% da altura adulta, e, quando os potros são submetidos a um programa nutricional deficiente durante esta fase, podem apresentar problemas ortopédicos, prejudicando sua vida adulta, principalmente, se esses problemas estiverem relacionados à deficiência ou excesso de proteína, energia e/ou minerais.

Apesar do Brasil possuir um período de chuva regular em determinadas épocas do ano, o que permite a adoção de sistema produtivo extensivo com o animal criado a pasto, a desmama dos potros ocorre no período seco, época em que há baixa qualidade e quantidade de forragens (Rezende et. al., 2015). Desse modo, como existe uma sazonalidade na produção das pastagens, é necessário o uso de estratégias de fácil execução e baixo custo, para suprir as necessidades nutricionais dos animais durante a época seca (Gollcher et al., 2010).

No entanto, a maioria das forrageiras que se adaptam às condições climáticas do Brasil apresentam concentrações de oxalato que podem predispor a ocorrência de osteodistrofia fibrosa (“cara inchada”), patologia frequente em diversos estados brasileiros, principalmente em Minas Gerais. Esta síndrome metabólica é caracterizada por osteopenia (diminuição da densidade mineral óssea) devido a exacerbada reabsorção óssea, levando à substituição do tecido ósseo por tecido fibroso (Curcio et al., 2010), além de predispor os animais a deposição de cristais insolúveis de oxalato nos rins, o que pode ocasionar lesão renal (Lewis, 2000). Uma vez instalada, a osteodistrofia fibrosa é irreversível, o que compromete o desempenho do animal por toda a sua vida (Rezende, 2012).

Isso ocorre, pois, o oxalato se liga ao cálcio (Ca) no intestino delgado, formando um complexo insolúvel denominado oxalato de Ca (Puoli Filho et al., 1999) e, conseqüentemente, reduz a biodisponibilidade do Ca (Kienzle e Zorn, 2006). A indisponibilidade deste mineral reduzirá a relação Ca:P, provocando aumento da concentração do paratormônio (PTH) como forma de regular a homeostase do Ca e P por meio da mobilização de Ca dos ossos e redução

na sua excreção, além do aumento na excreção urinária de P (Estepa et al., 2006; Gracitelli et al., 2002).

Desse modo, este estudo teve como principal objetivo, avaliar os efeitos do consumo de uma forrageira com alto teor de oxalato (*Pennisetum purpureum*), associado ao consumo de um sal mineral com diferentes relações de Cálcio:Fósforo (Ca:P) sobre o metabolismo do cálcio em potros Mangalarga Marchador.

## CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. A equideocultura no Brasil

No Brasil, a agropecuária é uma das atividades de maior importância econômica para o país, sendo que a equideocultura tem cada vez mais se destacado. Segundo Lima e Cintra (2016), o complexo do agronegócio do cavalo movimenta cerca de R\$ 16,15 bilhões por ano, rendendo de forma direta 610 mil empregos e cerca de 2,5 milhões de empregos indiretos em diversos segmentos como insumos, criação e destinação final.

Minas Gerais é considerado o berço de importantes raças equíneas marchadoras, como o Mangalarga Marchador, Campolina e Jumento Pêga. Consequentemente, os modelos produtivos empregados no estado são considerados referência por criadores e usuários dessas espécies em todo país. Por outro lado, o manejo adotado em muitas propriedades rurais mineiras ainda está baseado no empirismo e o tradicionalismo se encontra fortemente presente na equideocultura do estado.

Segundo a opinião de 85,2% dos criadores mineiros entrevistados por Vieira et al. (2015), dentre os principais entraves para o desenvolvimento do setor estão: mercado e custo de produção; baixa qualificação e alto custo da mão de obra; escassez de políticas públicas para incentivo da atividade e problemas relacionados com os manejos, especialmente nutricional e sanitário. Diante dessa realidade, muitas vezes instalam-se sistemas de produção de equídeos com caráter extrativista e predatório, responsáveis pela disseminação de zoonoses, falta de controle de poluentes e uso de animais com baixo desempenho produtivo, causado por problemas relacionados com a saúde e bem-estar animal.

Apesar de uma discreta produção para o consumo da carne, a grande maioria dos equinos produzidos mundialmente é destinada para montaria como forma de lazer, esporte e para auxiliar nos trabalhos rurais. Dessa forma, o principal objetivo da equideocultura é a produção anual de um potro por égua, sendo importante a oferta de indivíduos com qualidades

físicas e psicológicas para atender o desejo do mercado consumidor a que se destinam (Fernandes, 2009; Barros, 2017).

### **1.1.1. A importância da nutrição do potro**

A partir do desmame, é fundamental que na alimentação do potro estejam presentes proteínas de alta qualidade e quantidade suficiente de vitaminas e minerais, devido ao rápido desenvolvimento ósseo e muscular, com especial atenção ao cálcio e ao fósforo que deverão estar em uma relação adequada (Rezende et al., 2015).

Equinos jovens atingem 90% da sua altura final durante o primeiro ano de vida, assim para que o animal alcance seu potencial de crescimento e desenvolvimento é necessária uma alimentação equilibrada. Devido ao seu rápido crescimento, quando os potros recebem dietas que estão desbalanceadas, ou seja, com relações minerais inadequadas ou proteína e energia acima do limite recomendado, podem ocorrer afecções ortopédicas de desenvolvimento (Donabédian et al., 2006). Deficiências de cálcio no equino em crescimento geralmente causam problemas nos membros, como aumento das articulações, exostose na união do osso metacarpiano ao osso acessório principal, além da síndrome comumente chamada de epifisite (Lewis, 2000).

Dessa forma, uma alimentação equilibrada nutricionalmente e na quantidade adequada permitirá ao potro ótimo desenvolvimento e crescimento, o que refletirá em um adulto de qualidade (Cintra, 2014).

### **1.2. A importância da forrageira na nutrição equina**

A nutrição animal é um dos principais custos do sistema de produção de equinos, sendo importante a adoção de atitudes que auxiliem na viabilidade econômica da criação como, por exemplo, uso de alimentos mais econômicos (Lima et al., 2006). Em Minas Gerais, Vieira et al. (2015) observaram que o maior gasto da equideocultura mineira é com a mão de obra, seguida pela alimentação dos animais, estimando-se uma movimentação em torno de 260 milhões de reais por ano.

Por outro lado, esses alimentos não podem predispor a ocorrência de doenças ou perda no desempenho animal, especialmente nas categorias mais exigentes como potros, éguas em reprodução e cavalos em atividade física (Lewis, 2000).

Os equinos são herbívoros não ruminantes e, portanto, a base de sua alimentação são as forrageiras oferecidas na forma fresca ou conservadas, correspondendo a mais de 50% da matéria seca da dieta. Segundo Rezende et al. (2015), equinos que não recebem quantidade

adequada de fibra na dieta podem desenvolver quadros clínicos como laminite, cólica e outros distúrbios gástricos, além de alterações comportamentais como a coprofagia, vício de roer madeira, dentre outros.

O Sistema Brasileiro de Criação de Equídeos proposto por Carvalho e Haddad (1987) preconiza a utilização de pastagens, devido à disponibilidade de área e do clima favorável para a produção de forragens existente no Brasil. Entretanto, esses autores ressaltaram a importância da escolha do volumoso adequado para a dieta desses animais, pois este deve atender às necessidades nutricionais, ter boa aceitabilidade e não apresentar contaminantes que prejudicam à saúde e bem-estar dos equinos. Além disso, é importante verificar a presença de fatores antinutricionais, como os oxalatos e fitatos.

Na tabela 1 são apresentadas as concentrações de cálcio, fósforo, oxalato total e relação Cálcio:oxalato de algumas gramíneas comumente utilizadas na alimentação de equinos no Brasil. Pode se verificar que a relação Cálcio:oxalato em muitas dessas gramíneas, incluindo o capim elefante variedade Napier, está abaixo de 0,5:1, o que pode comprometer a absorção do cálcio, predispondo os animais que consomem essas gramíneas à síndrome metabólica do hiperparatireoidismo nutricional secundário (Rezende et al., 2015).

Tabela 1. Concentrações de cálcio, fósforo, oxalato total e razão cálcio/oxalato na matéria seca das folhas de gramíneas tropicais

<b>Forrageira</b>	<b>Cálcio</b>	<b>Fósforo</b>	<b>Oxalato Total</b>	<b>Cálcio/oxalato</b>
Setária	0,27	0,25	2,80	0,10
Humidícola	0,31	0,10	1,80	0,23
Colonião	0,30	0,14	2,21	0,13
Tanzânia	0,54	0,24	1,93	0,27
Bengo	0,62	0,17	2,20	0,28
Quicuío	0,36	0,36	1,30	0,28
Tangola	0,34	0,13	1,55	0,22
Transvala	0,53	0,12	2,30	0,23
Dictioneura	0,21	0,17	1,62	0,13
Aruana	0,37		2,16	0,16
Mombaça	0,35	0,20	1,08	0,32
Napier	0,29	0,21	2,98	0,09
Buffel	0,16	0,44	2,11	0,20

Capim Gordura	0,55	0,20	1,05	0,52
Capim Vaqueiro	0,43	0,13	0,35	1,31
Jiggs	0,95	0,32	0,18	5,27
Coast Cross	0,61	0,32	0,35	1,75
Andropogon	0,47	0,18	0,18	2,61
Ruzizienses	0,40	0,20	0,00	0,0
Rhodes	0,85	0,23	0,00	0,0
Tierra verde	0,42	0,21	0,00	0,0
Estrela Africana	0,96	0,43	1,08	0,52
Massai	0,59	0,15	0,36	1,63
Tifton	0,60		0,16	3,75
Hematria	0,71		0,44	1,61

Fonte: Pupo (1989); Pagan (2009); NRC (2007); arquivo pessoal.

### 1.2.1. Uso do capim elefante na alimentação equina

Segundo os criadores entrevistados por Vieira et al. (2015), um dos fatores mais limitantes para o crescimento da equideocultura é o manejo nutricional, devido à dificuldade de se conseguir suprir a demanda nutricional dos animais durante o período da seca. De acordo com Domingues (2009), na seca existe redução na produção das pastagens, o que torna necessário o uso de forrageiras conservadas para complementar a alimentação dos equinos. A produção de fenos de gramíneas ou leguminosas é bastante onerosa e há grande demanda da sociedade por estudos que apresentem alternativas mais econômicas para a nutrição adequada de equinos.

Na prática, o uso de capineiras, silagens e cana-de-açúcar na alimentação de equinos é frequentemente observado durante o período da seca nas propriedades mineiras. Porém, faltam informações técnicas científicas para orientação sobre a utilização desses alimentos na dieta dos equinos, sem que ocorra comprometimento de seu desempenho esperado.

As forrageiras tropicais são mais adaptadas às condições edafoclimáticas brasileiras, sendo frequentemente utilizadas na alimentação dos equinos. As cultivares de *Pennisetum purpureum* (cultivares *Cameroon*, *Napier*, *Mercker*, *Comum*, *Mott* e Híbridos interespecíficos) são as mais representativas do gênero *Pennisetum* devido ao seu alto potencial produtivo, sendo comumente chamadas de capim-elefante (Reis et al., 2013).

No entanto, deve-se considerar que diversas gramíneas tropicais, incluindo o capim-efefante podem acumular em sua composição o oxalato, um fator antinutricional que, em concentrações elevadas é tóxico para os equinos (Rahman e Kawamura, 2011). De acordo com Blaney et al. (1981), as gramíneas que apresentam relação Ca:oxalato total inferior a 0,5:1, contendo mais de 0,5% de oxalato total são consideradas potencialmente perigosas quando utilizadas por períodos prolongados como única fonte de volumoso para equinos.

Silvestre (2017) observou relações entre Ca:oxalato menores que 0,5 no capim-efefante entre 1,00 e 2,60 m de altura, tanto no período chuvoso quanto no período seco, e o teor de oxalato foi superior a 0,5%, o que poderia reduzir a absorção do cálcio dietético em equinos.

### **1.3. Hiperparatireoidismo nutricional secundário**

O Hiperparatireoidismo Nutricional Secundário (HNS), também chamado de Osteodistrofia Fibrosa e popularmente de “Cara Inchada”, é um distúrbio metabólico ocasionado pela redução da concentração sanguínea de cálcio (Ca), que induz aumento na secreção de paratormônio (PTH) para retirada deste mineral dos ossos visando manter a homeostase sanguínea. A etiologia dessa síndrome metabólica está relacionada ao fornecimento de dietas com relação Ca:P inadequada, na maioria das vezes ocasionada por ingestão de gramíneas com concentrações elevadas de oxalato. Esse distúrbio metabólico também pode acontecer em rebanhos que recebem suplementação com grãos, pois esses alimentos possuem relação Ca:P muito baixa e, portanto, se forem oferecidos aos equinos, devem ser balanceados com suplemento rico em Ca (Rezende e Costa, 2009). A hipovitaminose D também pode causar o hiperparatireoidismo nutricional secundário nos animais que são mantidos estabulados, mas essa deficiência é rara no rebanho equino brasileiro, onde, na maioria dos criatórios, os animais são criados de forma extensiva ou semiextensiva e têm acesso a luz solar durante tempo suficiente para suprir sua necessidade de vitamina D.

O principal sinal clínico do HNS é o aumento dos ossos da face, geralmente bilateral e simétrico, decorrente à tumefação e amolecimento ósseo. Em casos mais severos, dispneia e dificuldade de deglutição podem ser observados devido à deformidade óssea (Puoli-Filho et al., 1999; Méndez & Riet-Correa, 2007). Segundo Smith (1993) os ossos da cabeça são os mais gravemente acometidos, havendo espessamento dos ossos mandibular, palatino, zigomático e lacrimal. Em casos de excessiva mobilização óssea ocorre uma hierarquia de

mobilização, sendo os ossos da mandíbula os primeiros a serem afetados, seguidos pelos ossos do crânio, costelas, vértebras e ossos longos (Jubb et al. 1993).

De acordo com Rezende et al. (2015), a deficiência de Ca no organismo animal pode ser provocada pela alta concentração de oxalato presente principalmente nas forrageiras tropicais. Quando os equinos ingerem gramíneas com altas concentrações de oxalato, a deficiência de Ca acontece porque esse mineral se liga ao oxalato no intestino delgado e forma um complexo insolúvel denominado oxalato de Ca (Puoli Filho et al., 1999). O oxalato presente nas pastagens, quando em concentrações maiores que 2% da matéria seca, causa redução na biodisponibilidade do Ca (Kienzle e Zorn, 2006). Deficiência de Ca decorrente do pastejo de plantas ricas em oxalatos e com baixa proporção Ca:oxalato ocorre em equinos de todas as idades, mas a incidência e a severidade parecem ser mais altas em éguas lactantes e nos potros ao desmame, devido às altas exigências de Ca destas categorias e ao alto consumo alimentar (Gobesso et al., 2021).

A regulação hormonal da homeostase do Ca e do P é modulada principalmente pelo PTH, calcitonina e 1,25-dehidroxicolecalciferol (vitamina D), os quais atuam simultaneamente nos ossos, intestinos e rins. Desse modo, a indisponibilidade do Ca ocasionada pelas altas concentrações de oxalato reduzirá a relação Ca:P, provocando aumento da concentração de PTH como forma de regular a homeostase. O PTH é responsável pela mobilização de Ca dos ossos e redução na sua excreção, além do aumento na excreção urinária de P. Sendo assim, o aumento do P, vindo da dieta, e a redução do Ca estimulam a secreção de PTH para que ocorra reabsorção de Ca dos ossos a fim de manter a relação Ca:P no sangue dentro dos valores fisiológicos, numa relação de 2:1 (Estepa et al., 2006; Gracitelli et al., 2002).

Os desequilíbrios minerais são geralmente de difícil diagnóstico até que se tornem graves com características irreversíveis. Por isso, o diagnóstico do HNS deve ser baseado principalmente no histórico clínico, manejo, alimentação e análise mineral da dieta (Ronen et al., 1992). A concentração sérica de minerais no animal não sofrerá alterações significativas, pois com a secreção do PTH, o animal manterá a relação Ca:P dentro dos valores fisiológicos. Porém, de acordo com Toribio (2011) algumas análises podem auxiliar no diagnóstico dessa desordem metabólica, como a dosagem da concentração de PTH, calcitonina e exames radiográficos.

### **1.3.1. Parâmetros bioquímicos**

Parâmetros bioquímicos são utilizados como ferramenta que podem auxiliar na clínica e no manejo alimentar dos equinos (Ferreira et al., 2006). As concentrações dos metabólitos ou enzimas sanguíneas podem servir como referência para o diagnóstico de distúrbios metabólicos se estiverem acima ou abaixo dos níveis considerados normais para a fisiologia de cada animal. Para Wittwer (1995), quando os valores analisados não condizem com os valores de referência, pode significar que os animais estão em desequilíbrio nutricional ou sofreram alterações orgânicas que levaram à redução na capacidade de utilização de um determinado nutriente.

Por meio de avaliação da composição bioquímica sanguínea, é possível diagnosticar lesões teciduais, transtornos no funcionamento de determinado órgão, adaptação do animal ao manejo nutricional, desequilíbrios metabólicos específicos e intoxicações, permitindo assim, descrever a situação metabólica que os tecidos animais se encontram (González e Scheffer, 2002).

Sendo assim, em animais com suspeita de patologias inespecíficas, é comum a avaliação das concentrações sanguíneas de minerais, como Ca, P e Mg, além de enzimas, como gama-glutamilttransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA), visto que os resultados refletem a saúde do animal.

#### **1.3.1.1. Cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e gama-glutamilttransferase**

Segundo Lewis (2000), as concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina (FA), Ca e P têm pouco benefício no diagnóstico dos desequilíbrios dietéticos de Ca, pois flutuam com pequena alteração consistente ocorrendo como resultado do consumo de Ca inadequado ou excessivo. Além disso, os achados laboratoriais podem estar dentro dos limites normais se o animal estiver ingerindo uma dieta equilibrada. Dessa forma, cavalos com HNS preservam a normocalcemia às custas das reservas esqueléticas e não desenvolvem sinais de hipocalcemia aguda (Toribio, 2011).

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima que retira o P das proteínas e dos nucleotídeos. Está presente em todo o organismo na forma de isoenzimas específicas para cada tecido. Altas concentrações de FA são encontradas no fígado e nos ossos, portanto, elevações na dosagem sérica desta enzima ocorrem por alterações hepáticas, alta remodelação óssea ou metástases ósseas. Desse modo, a dosagem da FA nos pacientes com HNS, desde que não apresentem alterações hepáticas, serve como um teste adjunto no diagnóstico e como um parâmetro no acompanhamento do tratamento (Gueiros et al., 2011).

A gama-glutamilttransferase (GGT) é uma enzima de membrana presente principalmente nas células epiteliais dos ductos renais e biliares, além de ser encontrada no fígado, rins, pâncreas e intestino (Ceriotti et al., 2010).

Quando são observadas concentrações de GGT acima dos valores de referência, mesmo que esteja em muitos tecidos, essa alteração está primariamente relacionada com doenças hepáticas, especialmente nos ductos biliares (Kaneko et al., 2008). Entretanto, quando a GGT está dentro dos valores de referência e a FA encontra-se aumentada, significa que esta elevação está relacionada à presença de alterações dos tecidos ósseos.

Ronen et al. (1992) verificaram concentrações séricas de Ca, P e FA dentro dos valores de referência em equinos diagnosticados com HNS, exceto em um dos casos, o qual o animal apresentava aumento da concentração de FA, além de grave alargamento do maxilar e comprometimento da marcha. Em contrapartida, em todos os casos havia outras alterações presentes como a concentração de PTH e excreção urinária de P.

Entretanto, Maidana et al. (2014) observaram em equinos com HNS aumento ( $P < 0,05$ ) na concentração de P em relação aos valores de referência, enquanto as concentrações de Ca se mantiveram dentro da faixa de referência, exceto para uma égua, que apresentou quadro avançado de HNS e concentração sérica de 17,2 mg/dL de Ca. Como resultado, a relação Ca:P reduziu significativamente (aproximadamente 1:1), demonstrando mobilização limitada do Ca ósseo, o que possibilitou redução na razão sérica desses minerais.

Do ponto de vista fisiopatológico, devido ao estabelecimento de um quadro de osteodistrofia grave, decorrente de evolução crônica da doença, ocorre menor mineralização óssea com o Ca e como consequência haverá menor disponibilidade para mobilização adicional deste mineral. Ao mesmo tempo, há persistência de alta concentração de P, devido à alta ingestão e absorção diária da dieta. Sendo assim, o organismo apresentará maior dificuldade em mobilizar o Ca.

#### **1.3.1.2. Magnésio**

Além do Ca e P, o magnésio (Mg) é um macromineral essencial ao crescimento e desenvolvimento ósseo (Meacham, 1984). De acordo com o NRC (2007), 60% do Mg do organismo encontra-se nos ossos e cerca de 30% na musculatura.

O papel do Mg tem recebido menos atenção do que o Ca em pacientes críticos, provavelmente porque, por serem herbívoros, os equinos não sofrem deficiência desse mineral. Isso acontece porque, geralmente, as pastagens possuem concentrações desse mineral

próximas às suas exigências nutricionais, que vão de 2,56 g a 6,78 g de Mg por kg de matéria seca por dia para cavalos em crescimento (NRC, 2007).

Em humanos, a deficiência de Mg pode resultar em hipocalcemia ligada à secreção prejudicada de PTH, bem como resposta renal e esquelética (Toribio et al., 2007). Ainda, acredita-se que o Ca adicional na dieta gera aumento na formação óssea e, conseqüentemente, aumento na retenção de Mg (NRC, 2007). Porém, estudos de equilíbrio sugerem que dietas com excesso de Ca diminuem a utilização de magnésio, mas tanto a deficiência quanto o aumento de Mg aumentam a absorção de Ca (Meacham, 1984).

Quando o oxalato é ingerido pelo animal, ele se une a cátions bivalentes, como Ca e Mg, diminuindo a disponibilidade e utilização desses minerais (Hintz et al., 1984; Miyasaki et al., 2003; Méndez & Riet-Correa, 2007). Além disso, segundo Wolter (1992), desbalanço na relação Ca:P prejudica a absorção de Ca, Mg e outros microelementos como o Zinco. Portanto, a suplementação com Mg deverá ser feita nas dietas de equinos ingerindo forrageiras com excesso de oxalato (NRC, 2007).

Os efeitos da deficiência de Mg na homeostase óssea não são muito bem esclarecidos, entretanto, existe alta correlação entre as concentrações deste mineral e o tecido ósseo (Rude et al., 2003).

#### **1.3.1.3. Paratormônio**

Um dos principais achados clínicos em equinos com HNS é o aumento da concentração sanguínea de PTH (Mendoza et al., 2017), visto que este hormônio age nos ossos, trato intestinal e rins para regular as concentrações plasmáticas de Ca.

Ronen et al. (1992) mostraram aumento na concentração de PTH nos três estudos de casos que avaliaram, mesmo sem observar alteração nos níveis séricos de Ca, P e FA, sendo que o animal que estava no estágio mais avançado da doença obteve o maior valor de PTH.

Em outro estudo de casos, Lacitignola et al. (2018) também observaram concentrações de PTH maiores que os valores de referência (75-95 pg/mL), em um pônei de 3 anos (567 pg/mL) e em outra de 5 anos de idade (>2000 pg/mL), as quais estavam em estágios avançados da doença, apresentando deformações ósseas visíveis. Em ambos os animais houve normocalcemia, hiperfosfatemia e concentrações de FA acima dos valores de referência.

Redução sérica de Ca aumenta a secreção de PTH pela glândula paratireoide, que por sua vez atua nos rins para aumentar a reabsorção de Ca e a síntese de vitamina D. Além disso,

também atua nos ossos para aumentar a reabsorção óssea osteoclástica (Toribio et al., 2007; Toribio, 2010).

Neste contexto, a redução do Ca sanguíneo, devido a sua indisponibilidade, estimula a secreção de PTH no cavalo. Além disso, a hiperfosfatemia inibe a síntese renal de vit D e, como a vit D inibe a função das células paratireoideanas, a hipovitaminose D contribui para a hiperplasia das células para-tireoidianas e, conseqüentemente, ocorre secreção excessiva de PTH (Toribio, 2011).

### **1.3.2. Avaliações radiográficas**

O PTH aumenta a atividade osteoclástica, reabsorção e perda óssea com acúmulo de tecido conjuntivo não mineralizado (osteodistrofia fibrosa) nos ossos o que é facilmente visualizado através do aumento da face (cabeça grande). Dessa forma, a avaliação radiográfica é recomendada, pois pode auxiliar no diagnóstico. Esses animais podem ter densidade óssea cortical e trabecular reduzida (compatível com osteopenia), deformidades esqueléticas e fraturas, embora a interpretação possa ser desafiadora em alguns casos, porque a perda óssea importante deve estar presente antes que seja evidente radiograficamente (Mendoza et al., 2017). Mas, para isso, a densidade óssea deve reduzir-se em 30% antes de ficar radiograficamente evidente (Lewis, 2000).

As deformidades angulares dos membros são alterações osteomusculares que se refletem nos ângulos articulares, principalmente na articulação metacarpo ou metatarso falangeano e no eixo falangeano distal (McIlwraith, 2004; Thomassian, 2005). São definidas como desvios do eixo vertical dos membros no seu plano frontal, denominando-os pelas articulações envolvidas., sendo muito comum em potros estabulados ou em dietas com concentrações inadequadas de proteína, energia e minerais (Bertone, 2002; Sperandio e Denadai, 2019). Neste contexto, a radiografia é um recurso indispensável para avaliar o ponto pivô (centro do desvio), sua natureza e o grau de desvio angular (Fiorin et al., 2017).

A espessura da cortical óssea está associada à rigidez do osso, sendo essa rigidez dependente da quantidade de forças a que esse osso está submetido (Palierno et al., 2006). O índice cortical pode ser quantificado por meio da relação entre o diâmetro da cavidade medular e a espessura da cortical, sendo que este parâmetro reflete a estrutura do osso e pode variar em situações de doenças ortopédicas ou em resposta às forças biomecânicas atuantes sobre o osso.

### 1.3.3. Análise metabolômica

De acordo com Marzzoco e Torres (2007) todos os organismos vivos constituem, em seu conjunto, um sistema estável de reações químicas e de processos físico-químicos mantidos à custa de energia. O processo de obtenção, armazenamento, utilização de energia e a transformação de precursores obtidos do meio em compostos característicos de cada organismo são efetuados por uma intrincada rede de milhares de reações químicas e constituem o que conhecemos por metabolismo (Figura 1).

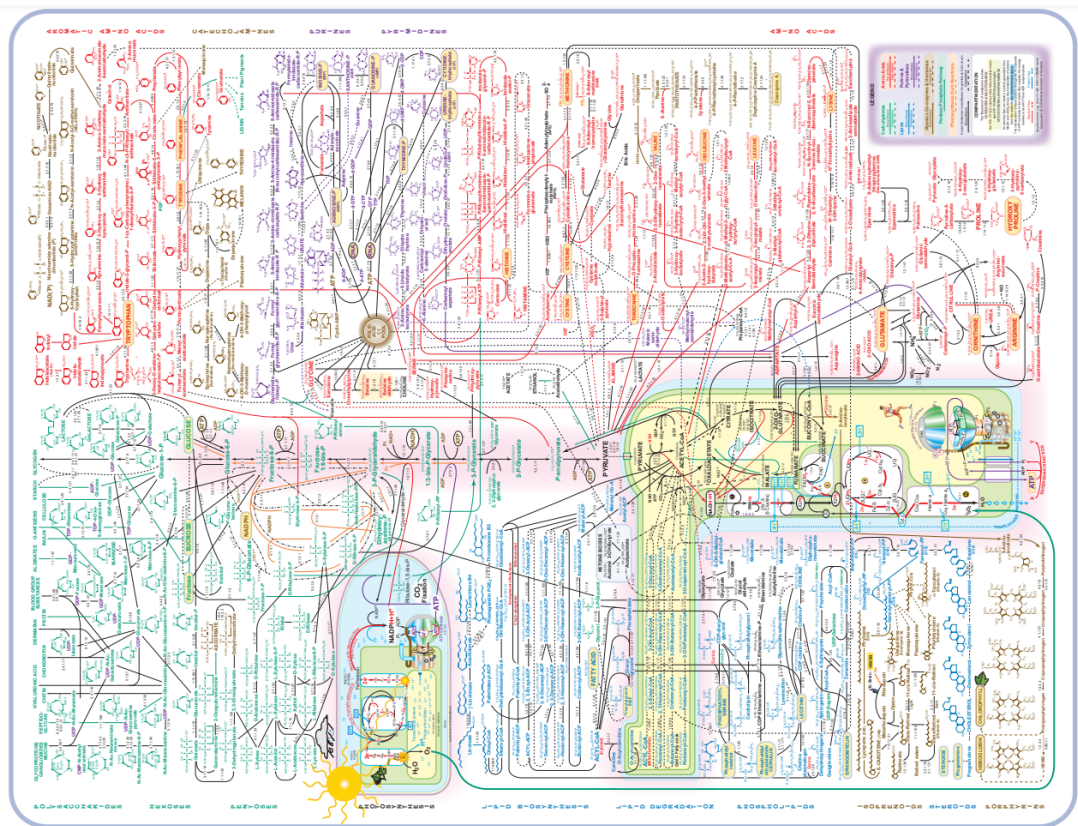


Figura 1. Diagrama demonstrando a complexidade e interligação entre as vias e reações metabólicas dos organismos

Fonte:

<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/261/398/metabolic-pathways-poster.pdf>

O termo metabolismo é definido essencialmente como uma série de reações químicas interligadas, com início com uma molécula em particular, a qual é convertida em uma ou mais moléculas diferentes, obedecendo a um padrão definido (Nelson e Cox, 2017).

Por meio da análise metabolômica é possível fazer avaliação global de todos os metabólitos presentes em uma amostra de tecido ou fluido (Cuperlovic-Culf et al., 2010), sendo capaz de revelar desequilíbrios homeostáticos nos sistemas biológicos, com grande capacidade de fornecer informações dos diversos biofluidos como o plasma, sangue total, soro, urina, saliva, líquido cefalorraquidiano e líquido sinovial (Zhang et al., 2012). Dessa forma, é possível determinar alterações nos perfis de pequenas moléculas relacionadas a uma determinada doença, uma intervenção terapêutica, modificação genética ou uma variação ambiental.

Os metabólitos são considerados os produtos do metabolismo e são representados por um grupo de estruturas de baixo peso molecular (<2000 Da), incluindo lipídeos, aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos, vitaminas, tióis e carboidratos (Zhang et al., 2012).

Este tipo de avaliação tem sido bastante utilizado para investigar o estado fisiológico dos organismos e na identificação de vias metabólicas alteradas em decorrência de afecções ou tratamentos instituídos (Zhang et al., 2012). Por meio do estudo dos metabólitos é possível definir o estado atual do sistema a ser estudado, como resultado da pressão ambiente e do potencial genético (Priori et al., 2013), o qual reflete alterações fenotípicas e funcionais (Putri et al., 2013; Ruggeri et al., 2013). Os níveis dos metabólitos endógenos e biomarcadores, envolvidos em determinada via celular, podem indicar características tanto fisiológicas quanto patológicas (Barthi, 2013).

Esta nova abordagem pertence à família das ciências “ômicas”, a qual é composta pela genômica, transcriptômica e proteômica (Figura 2), e é caracterizada por ser dirigida por dados, sem o uso de modelos pré-determinados.

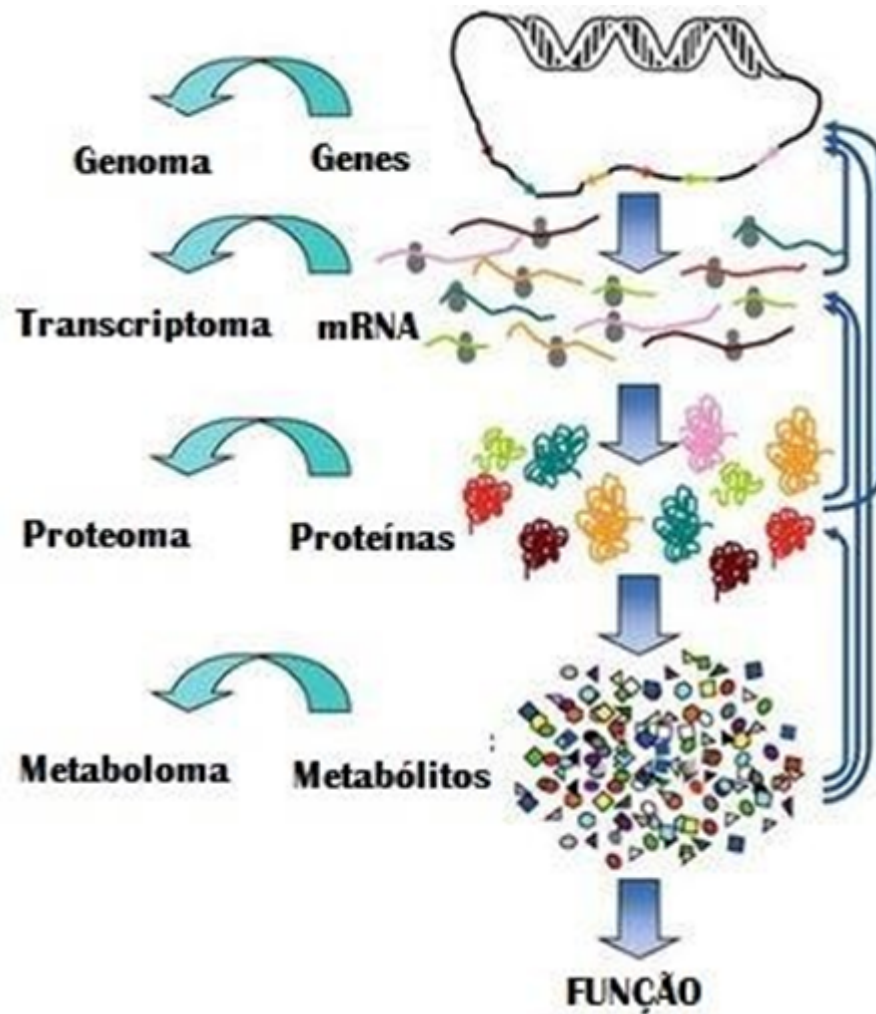


Figura 2. Representação da cascata das abordagens “ômicas”.

Fonte: Adaptado de Goodacre, 2005.

### 1.3.3.1. Conceitos da ressonância magnética nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) é uma técnica de exame da matéria baseada no conceito de que certos núcleos atômicos são intrinsecamente magnéticos. No entanto, apenas um número limitado de isótopos apresenta esta propriedade denominada *spin*, como o hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), carbono ( $^{13}\text{C}$ ), nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) e oxigênio ( $^{17}\text{O}$ ) (Berg et al., 2002). Desse modo, a  $^1\text{H}$  RMN baseia-se na medida da alteração do eixo de rotação do *spin* destes núcleos quando submetidos a um campo magnético.

Os núcleos das amostras que sofreram perturbação absorvem a radiação eletromagnética em uma frequência passível de mensuração. Com isso, os deslocamentos químicos, ou seja, as diferentes frequências, são expressas em unidades fracionais  $\delta$  (partes por milhão – ppm) de Hertz em relação ao deslocamento de um composto padrão (Berg et al., 2002).

### 1.3.3.2. Aplicações na medicina humana e veterinária

Devido seu caráter pouco invasivo e por sua alta sensibilidade, a análise metabolômica tem se tornado uma modalidade diagnóstica promissora, aprimorando a forma como a medicina identifica os biomarcadores das doenças e, conseqüentemente, resultando em avaliações globais do perfil metabólico dos pacientes. Este fato se torna essencial em casos em que o tratamento precoce é primordial para a recuperação, como a isquemia aguda do miocárdio (Bodi et al., 2013) e câncer (Putri et al., 2013), uma vez que fornece informações cruciais a respeito do metabolismo. Em tumores malignos, as concentrações de colina, inositol, alanina, glicina e fosforietanolamina aumentam de acordo com a malignidade dos tumores cerebrais (Kinoshita e Yokota, 1997), enquanto o lactato e alanina estão relacionados com câncer pulmonar (Fan et al., 2009) e os metabólitos colina, aminoácidos, taurina e lactato indicam a malignidade do câncer da vesícula biliar (Bharti et al., 2013).

Outra aplicação da análise metabolômica na medicina é nos distúrbios psiquiátricos e doenças do sistema nervoso central. Devido à dificuldade de um diagnóstico quantitativo, a análise metabolômica tem se tornado fundamental na determinação de um perfil metabólico para fins diagnósticos e na avaliação do tratamento (Putri et al., 2013).

Além disso, esta técnica tem sido amplamente utilizada na avaliação das doenças articulares, tais como a osteoartrite, artrite reumatóide, artrite séptica e gota (Van Der Wietmarschen et al., 2012; Hugle et al., 2012; Adams et al., 2012; Priori et al., 2013).

Nas ciências veterinárias, esta técnica ainda é pouco explorada, sendo que a maioria das pesquisas é direcionada às artropatias no modelo experimental canino (Damyanovich et al., 1999; Crovace et al., 2006).

Na medicina veterinária de equinos, Ralston et al. (2009) investigaram o perfil bioquímico do soro de potros Standardbred por meio da análise metabolômica. Os autores compararam potros filhos de um mesmo garanhão, com e sem osteocondrite dissecante (OCD) da articulação tibiotársica. Os resultados obtidos mostraram a clara separação entre os grupos doentes e hígidos por meio de métodos estatísticos de Análise da Componente Principal (PCA). Além disso, foram observados aumentos significativos nos níveis de colina, tirosina, treonina, lisil albumina e beta-glicose, assim como menores concentrações de aminoácidos, alfa-glicose e lipoproteínas de baixa densidade nos animais com OCD.

Existem diversas técnicas para realização da análise metabolômica, sendo que as mais comumente utilizadas são a Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massa (EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Barthi et al., 2013; Fitzpatrick & Young, 2013). Dentro do campo da metabolômica em biofluidos

destaca-se a técnica de RMN, por se tratar de uma excelente maneira de definir o perfil deste tipo de amostra, caracterizada como uma solução complexa (Zhang et al., 2012).

O HNS cria mudanças na via metabólica do animal, alterando os compostos e/ou suas quantidades que naturalmente se espera para o animal sadio. Desta forma, como pequenos desvios no metabolismo de animais sadios e acometidos de alguma patologia podem ser detectados por RMN, quando associada ao estudo de vários animais utilizando análise multivariada, poderia criar modelos estatísticos de pré-deteção desta patologia, gerando impressões digitais espectrais para animais acometidos em relação aos sadios. Além disto, dado ao enorme número de metabólitos, primários e secundários, detectados simultaneamente pela RMN e o resultados obtidos pela análise estatística da variação da quantidade destes metabólitos, seria possível entender os desvios sofridos pelo metabolismo, e compensar estes desvios durante o tratamento (Priori et al., 2013; Fitzpatrick & Young, 2013).

### **1.3.3.3. Análise da Componente Principal (PCA)**

O método estatístico de eleição para os dados da análise metabolômica é a Análise de Componente Principal (Principal Component Analysis - PCA), a qual consiste na determinação de novo sistema coordenado através do estudo da correlação entre as matrizes. A análise de componentes principais (PCA) é um método não supervisionado de análise exploratória, ou seja, que não faz uso de informações prévias sobre as distribuições das amostras e, que possibilita a deteção dos padrões essenciais no conjunto de dados.

Uma componente principal é definida por um par de pesos e escores, sendo os pesos responsáveis pela descrição das relações entre as variáveis e os escores pela descrição das relações entre as amostras, em cada componente principal. Portanto, similaridades e diferenças entre amostras ou variáveis podem ser vistas através de gráficos de escores ou pesos, respectivamente, de uma componente principal versus outra.

As componentes principais são obtidas de modo a descrever a máxima variância nos dados e são calculadas em ordem decrescente de importância. Em outras palavras, a primeira componente principal sempre descreve maior variância do que a segunda componente, que por sua vez descreve maior variância que a terceira e assim sucessivamente.

Desta forma, a PCA fundamenta-se na correlação entre as variáveis e assim reduz a dimensionalidade dos dados permitindo que determinadas informações fiquem mais evidentes (WOLD et al., 1987).

#### 1.4. Referências Bibliográficas

- ADAMS JR., S. B.; SETTON, L. A.; KENSICKI, E. et al. Global metabolic profiling of human osteoarthritic synovium. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 20, p. 64-67, 2012.
- BARROS, B. S.; OLIVEIRA R. A. Cio do potro: o que é e quando utilizar? *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 41, n. 3, p. 665-670, 2017.
- BARTHI, S. K.; BEHARI, A.; KAPOOR, V. K. et al. Magic angle spinning NMR spectroscopic metabolic profiling of gall bladder tissues for differentiating malignant from benign disease. *Metabolomics*, v. 9, p. 101-118, 2013.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Exploring proteins: Nuclear Magnetic Resonance can reveal the structures of protein solutions*. In: W. H. Freeman, Biochemistry, 5 ed. New York, 2002, p. 77-115.
- BERTONE, A.L. *Part V: the carpus*. In: STASHAK, T.S. Adam's lameness in horses. 5.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2002. p.830-863.
- BLANEY, B. J.; GARTNER, R. J. W.; MCKENZIE, R. A. The effects of oxalate in some tropical grasses on the availability to horses of calcium, phosphorus and magnesium. *The Journal of Agricultural Science*, v. 97, n. 3, p. 507-514, 1981.
- BODI, V.; MARRACHELLI, V. G.; HUSSER, O. et al. Metabolomics in the Diagnosis of Acute Myocardial Ischemia. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, vol. 6, p. 808–815, 2013.
- CARVALHO, R. T. S.; HADDAD, C. M. O. *Pastagens e alimentação de equinos*. Piracicaba: FEALQ, 1987. 85p.
- CERIOTTI, F.; HENNY, J; QUERALTÓ, J. et al. "Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) in serum: results from an IFCC multicenter study" *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 48, no. 11, pp. 1593-1601, 2010.
- CINTRA, A.G.C.O *Cavalo: características, manejo e alimentação*. Reimpr. São Paulo: Roca, 2014. 363 p.
- CROVACE, A.; LATICIGNOLA, L.; MIOLO, A. Surgery plus chondroprotection for canine cranial cruciate ligament (CCL) rupture. A proton-NMR study. *Veterinary and Comparative Orthopaedia and Traumatology*, v. 19, p. 239-245, 2006.
- CURCIO, B. R.; LINS, L. A.; BOFF, A. L. N. et al. Osteodistrofia fibrosa em equinos criados em pastagens de Panicum maximum cultivar Aruana: relato de casos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.1, p.37-41, 2010.

- CUPERLOVIC-CULF, M; BARNETT, D. A.; CULF, A; IANCHUTE, I. Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discovery Today*, v. 0, n.0, 2010.
- DAMYANOVICH, A. Z.; STAPLES, J. R.; CHAN, A. D. M.; MARSHALL, K. W. Comparative study of normal and osteoarthritic canine synovial fluid using 500 MHz <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 17, p. 223-231, 1999.
- DOMINGUES, J.L. Uso de volumosos conservados na alimentação de equinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.38, p.259-269, 2009.
- DONABÉDIAN, M.; FLEURANCE, G.; PERONA, G. et al. Effect of fast vs. moderate growth rate related to nutrient intake on developmental orthopedic disease in the horse. *Animal Research*, v.55, n.5, p.471-486, 2006.
- ESTEPA, J.C.; AGUILERA-TEJERO, E.; ZAFRA, R. et al. An unusual case of generalized soft-tissue mineralization in a suckling foal. *Veterinary Pathology*, v.43, p.64-67, 2006.
- FAN, T. W.; LANE, A. N.; HIGASHI, R. M. et al. Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (<sup>13</sup>C) stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Molecular Cancer*, v. 8, n. 41, p. 8-41, 2009.
- FERNANDES, R.S. *Estudo da Puberdade na Cavalos Puro-Sangue Lusitano em condições de manejo tradicional*. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) - Universidade de Lisboa, Lisboa 2009.
- FERREIRA, R; LACERDA, L; CAMPOS, R. et al. Hematologic and biochemical parameters in three high performance horse breeds from southern Brazil. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.11, n.2, p. 40-44. 2006.
- FITZPATRICK, M.A.; YOUNG, S.P. Metabolomics: a novel window into inflammatory disease. *Swiss Medical Weekly*, v. 143, 13743, 2013.
- FIORIN, E. V.; NETO, N. D. B.; ALBUQUERQUE, R. S. et al. Deformidades angulares associadas aos carpos em potros. *X Mostra Científica FAMEZ*, 2017.
- GOODACRE, R. Metabolomics – the way forward. *Metabolomics*, vol. 1, n. 1, p. 1- 2, 2005.
- GUEIROS, J. E. B.; HERNANDES, F. R.; KAROHL, C.; JORGETTI, V. Prevenção e tratamento do hiperparatireoidismo secundário na DRC. *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 33, n. 2, p. 189-247, 2011.
- GONZÁLES, F. H. D; SCHEFFER, J. F. S. Perfil sanguíneo: Ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais. *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 29, p. 5–17, 2002.

- GRACITELLI, M. E. C.; VIDORIS, A. A. C.; LUBA, R. et al. Paratormônio e Osteoporose: Encontrando o fio da meada. Bases fisiológicas para utilização do PTH no tratamento da osteoporose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, vol. 46, n. 3, p. 215-220, 2002.
- HINTZ, H. F.; SCHRYVER, H. F.; DUTY, J. et al. Oxalic acid content of alfalfa hays and its influence on the availability of calcium, phosphorus and magnesium to ponies. *Journal of animal Science*, 1984, v. 58, p. 939-942.
- HÜGLE, T.; KOVACS, H.; HEIJNEN, I. A. F. M. et al. Synovial fluid metabolomics in different forms of arthritis assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 30, p. 1-6, 2012.
- JUBB, K.V.F. et al. *Pathology of domestic animals*. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1993. 181p.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6 ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. 916p
- KIENZLE, E.; ZORN, N. (2006, March). *Bioavailability of minerals in the horse*. In: Proceedings of the 3rd European Equine Nutrition & Health Congress. Merelbeke, 2006. p. 27-36.
- KINOSHITA, Y.; YOKOTA, A. Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, vol. 10, p. 2-12, 1997.
- LACITIGNOLA, L. et al. Nutritional secondary hyperparathyroidism in two ponies. *Open Veterinary Journal*, v. 8, n. 2, p. 149-153, 2018.
- LEWIS, L. D. *Nutrição clínica eqüina: alimentação e cuidados*. São Paulo: Roca, 2000. 710 p.
- LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. *Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. 56p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view>. Acesso em 16 nov. 2021.
- MAIDANA, L.; AVALOS, A.; CACERES, L. Osteodistrofia fibrosa nutricional en equinos criados sobre pastura de *Panicum máximum* variedad *Gatton panic* en la localidad de Boquero - Alto Paraguay. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, v. 4, n. 1, p. 30-35, 2014.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica básica*. 3 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2007, 360p.

- MCILWRAITH, C.W. Developmental Orthopedic Disease: Problems of limbs in young horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.24, p.475-479, 2004.
- MEACHAM, V. B. A review of calcium, phosphorus and magnesium metabolism in horses. *Equine Veterinary Science*, v. 4, n.5, p. 210-214, 1984.
- MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F. Osteodistrofia Fibrosa. In: RIET-CORREA, F.; MENDOZA, F. J. Nutritional secondary hyperparathyroidism in equids: Overview and new insights. *Equine Veterinary Education*, v. 29, p. 558-563, 2017.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry*. 7 ed. Nova York: W.H. Freeman, 2017, 1348p.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient Requirements of Horses*. 6. Ed. Washington D.C. NRC, 2007. 341 p.
- PAGAN, J. D. *Forages: the foundation for equine gastrointestinal health*. In: Advances in equine nutrition, IV. PAGAN, J. D. Kentucky Equine Research, 2009. 443 p.
- PALIERNE, S.; ASIMUS, E.; MATHON, D. et al. Geometric analysis of the proximal femur in a diverse sample of dogs. *Research in Veterinary Science*, v.80, p.243-252, 2006.
- PRIORI, R.; SCRIVO, R.; BRANDT, J. et al. Metabolomics in rheumatic diseases: The potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis and treatment efficacy. *Autoimmunity Reviews*, v. 12, n. 10, p. 1022- 30, 2013.
- PUOLI FILHO, J. N. P. et al. Suplementação mineral e mobilização de cálcio nos ossos de equinos em pastagem de Brachiaria humidicola. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 34, n.5, p. 873-878, 1999.
- PUPO, N. I. H. Aspectos gerais sobre formação e manejo de pastagens para equinos. *Anais do Encontro Nacional de Equideocultura*, v.5, p. 41-63, 1989.
- PUTRI, S.; NAKAYAMA, Y.; MATSUDA, F. et al. Current metabolomics: Practical applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 115, n. 6, p. 579-589, 2013.
- RAHMAN, M. M.; KAWAMURA, O. Oxalate accumulation in forage plants: some agronomic, climatic and genetic aspects. *Asian-Aust. Journal of Animal Science*, vol. 24, n. 3, p. 439-448, 2011.
- RALSTON, S.L.; PELCZER, I.; SHATYNSKI, C.; SPEARS, P.F. NMR-based metabonomic analysis of serum from standardbred yearlings with or without hock osteochondrosis desiccans lesions: preliminary study. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 29, n. 5, p. 385-386, 2009.
- REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. *Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos recursos Forrageiros*. Jaboticabal: Funep, 2013, cap. 8, p. 116-117.

- REZENDE, A. S. C.; COSTA, M. L. L. Pastagem: Saiba escolher a gramínea correta. *Revista Oficial da ABCCMM*, v.20, n.66, p.58-62, nov. 2009.
- REZENDE, A. S. C. A importância do sal mineral na nutrição dos equinos. *Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Pampa*, 2012.
- REZENDE, A. S. C.; SILVA, R. H. P.; INÁCIO, D. F. S. Volumosos na alimentação de equídeos. *Caderno de Ciências Agrárias*, v.7, n.1, 2015.
- RONEN, N.; VAN HEERDEN, J.; VAN AMSTEL, S. R. Clinical and biochemistry findings, and parathyroid hormone concentrations in three horses with secondary hyperparathyroidism. *South Africa Veterinary Journal*, v. 63, n. 3, p. 134-136, 1992.
- RUDE, R. K.; GRUBER, H. E.; WEI, L. Y.; FRAUSTO, A.; MILLS, B. G. Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse. *Calcified Tissue International*, n.72, p. 32-41, 2003.
- RUGGERI, B.; SARKANS, U.; SCHUMANN, G.; PERSICO, A. M. Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new. *Psychopharmacology*, v. 231, n. 6, p. 1201-1216, 2014.
- SILVESTRE, J. C. A. *Variação nas concentrações de oxalato, cálcio e fósforo no capim-elfante (Pennisetum purpureum schum. cv. cameroon) em diferentes alturas de corte e em diferentes estações do ano*. 2017. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras
- SMITH, B.P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, 1993. v.2. p.1310-1311.
- SPERANDIO, L. M. S; DENADAI, D. S. Deformidades angulares em potros - revisão de literatura. *Jornal MedVet Science FCAA*, v. 1, n. 1, p. 42, 2019.
- THOMASSIAN, A. *Afecções do aparelho locomotor*. In: THOMASSIAN, A. *Enfermidades dos cavalos*. 4. ed. São Paulo: Varela, 2005. p. 96-136.
- TORIBIO, R. E.; KOHN, C. W.; ROURKE, K. M. et al. Effects of hypercalcemia on serum concentrations of magnesium, potassium, and phosphate and urinary excretion of electrolytes in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 68, p. 543-54, 2007.
- TORIBIO, R.E. *Disorders of calcium and phosphorus*. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M.; SELLON, D.C. *Equine internal medicine*. St Louis: Saunders/Elsevier, 2010. p. 1277-1291.
- TORIBIO, R.E. Disorders of calcium and phosphate metabolism in horses. *The Veterinary Clinics of North America Equine Practice*, v. 27, n. 1, p. 129-47, 2011.

- VAN DER WIETMARSCHEN, H.A; DAI, W; VAN DER KOOIJ, A.J et al. Characterization of rheumatoid arthritis subtypes using symptom profiles, clinical chemistry and metabolomics measurements. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, p. 1-8, 2012.
- VIEIRA, E. R.; REZENDE, A. S. C.; LANAL, A. M. Q. et al. Caracterização da equideocultura no estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 67, n. 1, p. 319-323, 2015.
- GOBESSO, A.A.O.; WAJNSZTEJN, H.; RIBEIRO, R. M. et al. Comparison between different sources of minerals in horses with nutritional secondary hyperparathyroidism. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.73, n.1, p.73-81, 2021.
- WITTWER, F. Empleo de los perfiles metabólicos en el diagnóstico de desbalances metabólicos nutricionales en el ganado. *Buiatría Bovinos*, v. 2, p. 16-20, 1995.
- WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, p. 37-52, 1987.
- WOLTER, R. Dietética do cavalo atleta. *Simpósio Internacional de Não Ruminantes*, p. 273-312, 1992.
- ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P. et al. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *Journal of Proteomics*, v. 75, p. 1079-1088, 2012.

## **CAPÍTULO II - PERFIL METABÓLICO E AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE POTROS MANGALARGA MARCHADOR RECEBENDO GRAMÍNEA COM BAIXA RELAÇÃO CA:OXALATO E CONCENTRADO COM DIFERENTES RELAÇÕES DE CA:P**

### **2.1. RESUMO**

Potros alimentados com dietas deficientes em cálcio no primeiro ano de vida podem apresentar debilidades estruturais e distúrbios metabólicos que, conseqüentemente, depreciam seu valor econômico e futuro desempenho atlético. O *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) é utilizado na alimentação dos equídeos e apresenta alta concentração de oxalato, o qual pode formar composto insolúvel com o cálcio (Ca) dietético, reduzindo sua absorção. Este estudo teve por objetivo verificar se o consumo do capim elefante como única fonte forrageira, sal mineral *ad libitum* e concentrado suplementar com diferentes relações entre cálcio (Ca) e fósforo (P) afeta o metabolismo destes minerais em potros desmamados. Dezesesseis equinos machos, Mangalarga Marchador, entre 5 e 10 meses foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos diferenciados por receberem concentrado suplementar com relação Ca:P distinta (2:1; 3:1; 5:1; 6:1). Amostras sanguíneas foram coletadas antes do período de adaptação e aos 15, 43 e 71 dias após o fornecimento das dietas, para avaliar as concentrações de Cálcio (Ca), Fósforo (P), Paratormônio (PTH), fosfatase alcalina, (FA) gamaglutamiltransferase e para as análises metabólicas. Imagens radiográficas também foram realizadas para verificar o índice cortical (IC) e a ocorrência de deformidade angular. Para avaliar os resultados das análises sanguíneas e radiográficas utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso com arranjo de parcelas subdivididas. A avaliação metabólica foi feita por análise dos componentes principais e pela comparação visual dos espectros e da intensidade dos picos dos metabólitos de interesse. O consumo do capim elefante como única fonte de forrageira, juntamente com concentrado balanceado com relação Ca:P entre 2:1 e 6:1 durante 71 dias não interferiu no metabolismo do cálcio e nas variáveis radiográficas avaliadas (ângulo da deformidade e índice cortical) em potros pós desmama. A análise metabólica identificou 22 metabólitos com aumento dos metabólitos 3-hidroxiacetato, acetona, valina, isoleucina, leucina, creatina, fosfocreatina, creatinina, dimetilsulfona, glicose, piruvato, glicerol, N-acetilglicosamina, propionato, lactato, acetato, glicolato e taurina e redução de alanina, treonina e metionina, mostrando incremento do metabolismo energético em potros durante a fase de crescimento.

**Palavras-chave:** equinos em crescimento, forrageiras tropicais, nutrição animal, oxalato

## 2.2. ABSTRACT

Foals fed calcium-deficient diets in the first year of life may present structural weaknesses and metabolic disorders that, consequently, detract from their economic value and future athletic performance. *Pennisetum purpureum* (elephant grass) is used to feed horses and has a high concentration of oxalate, which can form an insoluble compound with dietary calcium (Ca), reducing its absorption. This study aimed to verify whether the consumption of elephant grass as the only forage source, mineral salt ad libitum and supplementary concentrate with different ratios between calcium (Ca) and phosphorus (P) affects the metabolism of these minerals in weaned foals. Sixteen male horses, Mangalarga Marchador, aged between 5 and 10 months were randomly assigned to 4 different groups by receiving supplemental concentrate with different Ca:P ratio (2:1; 3:1; 5:1; 6:1). Blood samples were collected before the adaptation period and at 15, 43 and 71 days after feeding the diets, to evaluate the concentrations of Ca, P, parathormone (PTH), alkaline phosphatase (FA) gammaglutamyltransferase and for metabolomic analysis. Radiographic images were also taken to verify the cortical index (CI) and the occurrence of angular deformity. To evaluate the results of blood and radiographic analysis, a randomized block design with split-plot arrangement was used. Metabolomic evaluation was performed by principal component analysis and by visual comparison of the spectra and peak intensity of the metabolites of interest. The consumption of elephant grass as the only forage source and balanced concentrate with a Ca:P ratio between 2:1 and 6:1 for 71 days didn't interfere with calcium metabolism in weaned foals. Metabolomics analysis identified 22 metabolites with increased metabolites 3-hydroxybutyrate, acetone, valine, isoleucine, leucine, creatine, phosphocreatine, creatinine, dimethylsulfone, glucose, pyruvate, glycerol, N-acetylglucosamine, propionate, lactate, acetate, glycolate and taurine and reduction of alanine, threonine and methionine, showing an increase in energy metabolism in foals during the growth phase.

**Keywords:** animal nutrition, growing horses, oxalate, tropical forages

## 2.3. INTRODUÇÃO

Os equinos possuem acelerado desenvolvimento no seu primeiro ano de vida, atingindo 90% da altura adulta, e, quando os potros são submetidos a um programa nutricional deficiente durante esta fase, podem apresentar problemas ortopédicos, prejudicando sua vida adulta, principalmente, se esses problemas estiverem relacionados à deficiência ou excesso de proteína, energia e/ou minerais.

No entanto, a maioria das forrageiras que se adaptam às condições climáticas do Brasil apresentam concentrações de oxalato que podem predispor a ocorrência de Osteodistrofia fibrosa (“cara inchada”), patologia frequente em diversos estados brasileiros, principalmente em Minas Gerais. Esta síndrome metabólica é caracterizada por osteopenia (diminuição da densidade mineral óssea) devido a exacerbada reabsorção óssea, levando à substituição do tecido ósseo por tecido fibroso (Curcio et al., 2010), além de predispor os animais a deposição de cristais insolúveis de oxalato nos rins, o que pode ocasionar lesão renal (Lewis, 2000). Uma vez instalada, a Osteodistrofia fibrosa é irreversível, o que compromete o desempenho do animal por toda a sua vida (Rezende, 2012).

Isso ocorre, pois, o oxalato se liga ao cálcio (Ca) no intestino delgado, formando um complexo insolúvel denominado oxalato de Ca (Puoli Filho et al., 1999) e, conseqüentemente, reduz a biodisponibilidade do Ca (Kienzle e Zorn, 2006). A indisponibilidade deste mineral reduzirá a relação Ca:P, provocando aumento da concentração do paratormônio (PTH) como forma de regular a homeostase do Ca e P por meio da mobilização de Ca dos ossos e redução na sua excreção, além do aumento na excreção urinária de P (Estepa et al., 2006; Gracitelli et al., 2002).

Desse modo, este estudo teve como principal objetivo, avaliar os efeitos do consumo de uma forrageira com alto teor de oxalato (*Pennisetum purpureum*), associado ao consumo de concentrado com diferentes relações de Cálcio:Fósforo (Ca:P) sobre o metabolismo do cálcio em potros Mangalarga Marchador.

## 2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 16 potros machos Mangalarga Marchador com idade inicial de 5 a 10 meses e peso vivo médio de  $148,97 \pm 8,56$  kg. Os potros eram provenientes do mesmo criatório e ficaram alojados em piquetes, sem cobertura vegetal, com acesso apenas a bebedouros, cochos cobertos para fornecimento da forrageira e sal mineral *ad libitum* e unidades de serviço individuais, onde foi oferecido o concentrado suplementar.

A fase experimental teve duração de 71 dias, sendo 15 dias para adaptação dos animais ao manejo e dietas experimentais e nos outros 56 dias os potros foram avaliados.

Os tratamentos experimentais foram os concentrados suplementares que eram isoenergéticos e isoprotéicos diferindo apenas na relação Ca:P, as quais foram 2:1, 3:1, 5:1 e 6:1, caracterizando os 4 tratamentos experimentais (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização os Grupos Experimentais

<b>Grupos Experimentais*</b>	<b>Dieta</b>	<b>Cálcio Concentrado</b>	<b>Cálcio Forragem</b>	<b>Oxalato Forragem</b>	<b>Ca:oxalato Dieta</b>
2:1	capim-elefante + concentrado com relação Ca:P de 2:1	1,34	0,49	2,32	0,60
3:1	capim-elefante + concentrado com relação Ca:P de 3:1	2,20	0,49	2,32	0,84
5:1	capim-elefante + concentrado com relação Ca:P de 5:1	3,62	0,49	2,32	1,25
6:1	capim-elefante + concentrado com relação Ca:P de 6:1	4,28	0,49	2,32	1,44

\*n=4

A composição das dietas experimentais encontra-se na Tabela 3. Essas dietas foram oferecidas aos potros na proporção de 1,2% de PV/dia, sendo que o valor calculado foi dividido em duas porções diárias (9h00 e 17h00), e fornecido individualmente nas unidades de serviço.

Tabela 3. Matéria seca da proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), cálcio (Ca), fósforo (P) e oxalato, dos concentrados suplementares e do capim elefante (*Pennisetum purpureum*)

Composição Química (%MS)	Concentrados Experimentais				Capim elefante
	2:1	3:1	5:1	6:1	
PB	17,59	17,68	17,69	17,59	5,87
EE	2,47	1,57	2,96	2,08	2,43
MM	12,40	13,76	13,0	13,36	9,26
FDN	17,05	17,47	16,41	16,02	75,53
FDA	7,29	7,08	7,07	6,88	56,38
Ca	1,34	2,2	3,1	3,62	0,49
P	0,62	0,63	0,62	0,61	0,52
Oxalato	-	-	-	-	2,33

Legenda: PB: proteína bruta, EE: extrato etéreo, MM: matéria mineral, FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido, Ca: cálcio, P: fósforo

As coletas de material para avaliação dos tratamentos foram feitas antes do fornecimento dos concentrados (dia 0) e aos 15, 43 e 71 dias após o fornecimento dos concentrados experimentais.

A área de capineira de capim-elefante foi manejada para que o ponto de corte durante todo o período experimental fosse feito quando o capim-elefante atingisse entre 60 e 90 dias de idade, com altura não superior a 1,8 m. Para fornecimento aos animais essa forrageira foi picada com 5 cm de comprimento e, logo após o corte, foi fornecido aos animais.

As coletas sanguíneas foram realizadas em tubos tipo *vacutainer*, sem anticoagulante, para as análises metabólicas e determinação das concentrações séricas de Ca, P, GGT (gamaglutamiltransferase), paratormônio (PTH), fosfatase alcalina (FA). As amostras foram centrifugadas para separação da fração líquida do sangue e, em seguida, congeladas a -20°C após acondicionamento em tubos *ependorf* de 2 mL para posteriores análises laboratoriais. As concentrações séricas de Ca, P, PTH, FA e GGT foram avaliadas no laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG através de kits comerciais (Bioclin®).

Para as análises metabólicas, foi pipetado 500µl da amostra que foi acondicionada em tubos de RMN contendo 50µl de água deuterada, utilizada para o *lock* no equipamento de RMN e padrão TSP (ácido trimetilsililpropanóico). A água deuterada age como solvente para

promover a estabilização da aquisição de dados. O instrumento “trava” na ressonância do deutério, a qual não será observada, atingindo uma estabilidade da frequência do campo. Isto é necessário, pois o campo magnético sofre pequenos desvios ao longo do tempo, o que a longo prazo produziria sinais espectroscopicamente amplos e descaracterizados. Em seguida, procedeu-se com a homogeneização por inversão total, tomando o cuidado para não haver formação de bolhas no interior dos tubos.

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN foram adquiridos no espectrômetro Bruker Avance III operado a 500.0 MHz para  $^1\text{H}$ . As amostras foram mensuradas a temperatura ambiente (25°C), utilizando a sequência de pulsos de Carr Purcell Meiboom Gill (CPMG) com pré-saturação do sinal da  $\text{H}_2\text{O}$ . A aquisição foi realizada adquirindo-se 32K, com tempo de aquisição de 1,6s (SW=20.61 ppm). O sinal remanescente da água foi suprimido com pré-saturação em onda contínua (CW) durante 1.2s, e 160 varreduras foram utilizadas para se obter uma boa relação sinal-ruído. Após a obtenção dos dados, os FIDs foram processados no software Topspin®, aplicou-se a multiplicação exponencial e a transformada de Fourier, a fase foi corrigida, a linha de base foi ajustada e os espectros foram calibrados usando pico DSS a 0ppm. Os picos foram atribuídos aos seus respectivos metabólitos usando a versão de teste do ChenomX NMR Suite 9.0 Profiler® Software (ChenomX Inc.).

Além disso, após as coletas sanguíneas foram realizadas duas incidências radiográficas das articulações metacarpofalângica e radiocarpometacarpiana esquerda, uma dorso-palmar e outra latero-medial. Essas radiografias foram feitas com uso de equipamento de raio-X portátil e todos os potros ficaram na mesma distância, em relação ao aparelho, sendo posicionados em estação forçada, em piso plano, sem inclinação, de modo a formar um paralelogramo retangular. O ambiente foi coberto de modo que não houvesse interferência por luz ou sombra sobre as regiões dos animais. As imagens radiográficas foram submetidas à revelação digitalizada e analisadas com auxílio do programa RadiAnt DICOM Viewer®, para determinação do grau do ângulo do desvio e índice cortical. Com o fim de mensurar o grau da deformidade angular, foram traçadas duas linhas medianas e paralelas ao eixo longitudinal dos ossos longos envolvidos. O ponto de intersecção das duas retas retrata o ponto pivô e o ângulo do desvio. Já o índice cortical (IC) foi calculado conforme fórmula a seguir, descrita por Rezende et al. (2000):

$$\text{Índice Cortical} = \frac{\text{largura total do osso} - \text{largura da cavidade medular}}{\text{largura total do osso}} \times 100$$

Os dados de concentrações séricas de Ca, P, GGT, PTH e FA e das análises radiográficas foram avaliados segundo o modelo de delineamento blocos ao acaso com arranjo de parcelas subdivididas, sendo as parcelas as proporções entre o Ca e o P e a subparcela os períodos de coleta (0, 15, 43 e 71). Foram realizados testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett para avaliar normalidade e homocedasticidade das variâncias, respectivamente. Com os resultados obtidos, foi estimado uma equação de regressão, no entanto, o valor de  $R^2$  foi menor que 0,5 para todas as variáveis avaliadas. Os resultados após análise de variância, foram submetidos a testes de média.

O método estatístico de eleição para os dados da análise metabolômica é a Análise de Componente Principal (Principal Component Analysis - PCA), a qual consiste na determinação de novo sistema coordenado através do estudo da correlação entre as matrizes. Além da Análise da Componente Principal, foram avaliados os espectros por comparação visual e pela comparação da intensidade dos picos dos metabólitos de interesse.

## **2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na Tabela 4 estão os resultados da bioquímica sérica, índice cortical e deformidade angular. Apesar dos grupos terem ingerido quantidades de cálcio distintas, não foi observada diferença nas variáveis avaliadas entre grupos ( $p>0,05$ ). Além disso, não houve efeito para interação Dieta x Tempo. Foi realizado cálculo para obter equação de regressão das variáveis, no entanto, o  $R^2$  foi menor que 0,5 para todas as variáveis avaliadas, mas houve diferença ( $p<0,05$ ) entre os tempos de avaliação nas concentrações séricas de Ca, P, FA e PTH e no ângulo da deformidade.

Tabela 4. Média das concentrações séricas de cálcio, fósforo, paratormônio, magnésio, gama-glutamyltransferase e fosfatase alcalina, além do ângulo da deformidade e índice cortical de potros Mangalarga Marchador alimentados com capim-elefante e concentrados com diferentes relações entre Ca:P no período após a desmama aos 0, 15, 43 e 71 dias de fornecimento da dieta

VARIÁVEL	0	15	43	71	CV (%)
Cálcio (mg/dL)	12,09a	11,90a	10,52b	10,52b	1,73
Fósforo (mg/dL)	4,59b	4,11b	7,21a	4,59b	8,05
Paratormônio (pg/dL)	5,19b	8,40b	31,24a	25,90a	37,84
Gama-glutamyltransferase (UI/L)	19,45a	19,73a	18,44a	17,69a	25,46
Fosfatase alcalina (UI/L)	416,48a	415,46a	387,12b	359,03b	9,56
Ângulo da deformidade (°)	3,26ab	3,34ab	2,74b	4,31a	13,46
Índice cortical (%)	45,82a	47,13a	46,99a	45,93a	10,71

Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferença entre os tempos de avaliação pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Houve redução ( $p < 0,05$ ) das concentrações séricas de Ca ao longo do tempo, sendo as médias encontradas em 43 e 71 dias após o fornecimento da dieta menores que os valores referência relatados para potros por Estepa et al. (2006), de 11,0 a 13,4mg/dL. Já em relação às concentrações séricas de P, pode se verificar que aos 43 dias de fornecimento da dieta essas médias foram maiores ( $p < 0,05$ ) que as encontradas nos dias 0, 15 e 71, porém todos os valores se encontram dentro do intervalo de referência de 4,3 a 9,3mg/dL, também relatados por Estepa et al. (2006).

Curcio et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo ao avaliar 38 equinos Mangalarga Marchador, com idade entre 6 meses e 3 anos de idade, mantidos em pastagem de Aruana que continha quantidades de oxalato entre 6,15 e 6,61%. Apesar dos animais terem apresentado Osteodistrofia fibrosa com sinais clínicos (aumento de volume dos ossos da face e fisite distal no rádio), ficou constatado que apenas em 10% as concentrações séricas de P estavam acima dos valores de referência (Estepa et. al, 2006), sendo que 61% apresentaram concentrações de Ca dentro dos valores de referência para potros (Estepa et. al,

2006). Segundo Radostits et al. (2002), em quadros de Osteodistrofia fibrosa pode ser observado concentrações séricas de Ca abaixo dos valores de referência, assim como foi observado no presente estudo, enquanto as de P podem estar aumentadas. No entanto, o desequilíbrio entre Ca:P na corrente sanguínea, provocado pela indisponibilidade do Ca na dieta, estimula a secreção do PTH para que ocorra reabsorção de Ca dos ossos visando manter a homeostase desses minerais (relação Ca:P de 2:1) no sangue (Estepa et al., 2006). Desse modo, as concentrações de Ca e P tendem a se manter dentro dos parâmetros de normalidade, pois cavalos com deficiência de Ca podem preservar a normocalcemia às custas das reservas esqueléticas, não desenvolvendo sinais de hipocalcemia aguda, já que os níveis de de Ca flutuam com pouca alteração, em consequência do consumo de Ca inadequado (Lewis, 2000). Isso justifica o aumento da concentração de P apenas aos 43 dias de fornecimento da dieta, sendo que aos 15 e 71 dias esse aumento não foi observado.

Já em relação ao PTH, o aumento da concentração desse hormônio é um dos principais achados clínicos em cavalos com HNS, pois ele atua para regular as concentrações plasmáticas de Ca (Mendoza et al., 2017). No presente experimento, houve aumento ( $p < 0,05$ ) da concentração sérica de PTH aos 43 e 71 dias de fornecimento da dieta estando associado à redução das concentrações séricas de Ca sugerindo alteração no metabolismo do Ca. No entanto as médias de PTH encontradas, estão dentro dos valores de referência de 4 a 65pg/mL descritos por Estepa et al, (2003). Em estudo desenvolvido em rebanho de éguas da raça Andaluz recebendo dieta contendo excesso de P e baixo Ca os pesquisadores verificaram que as éguas apresentavam concentrações séricas de PTH 10 vezes maiores que os valores de referência descritos por Estepa et al., (2003), de 4 a 65 pg/mL para equinos adultos

Quando os sinais clínicos da deficiência de Cálcio na dieta são sutis, o diagnóstico de HNS é difícil (Estepa et al. 2006). No passado, a excreção urinária fracionada (EF) de Ca e P era utilizada para fins diagnósticos. No entanto, por definição, um diagnóstico verdadeiro de HNS só pode ser feito quando se pode constatar elevadas concentrações séricas de PTH. Além disso, o grau de aumento do PTH pode ser usado para estimativa da gravidade da reabsorção óssea. No presente experimento, o aumento da concentração sérica de PTH aos 43 e 71 dias de fornecimento da dieta, associado à redução das concentrações séricas de Ca, pode ser um indicativo de que o oxalato tornou este mineral indisponível, interferindo no seu metabolismo. No entanto, deve-se levar em consideração que os valores encontrados estavam dentro dos valores descritos por Estepa et al. (2003) para potros (4 a 45 pg/dL) e, portanto, não é possível afirmar que os animais estavam sofrendo reabsorção óssea.

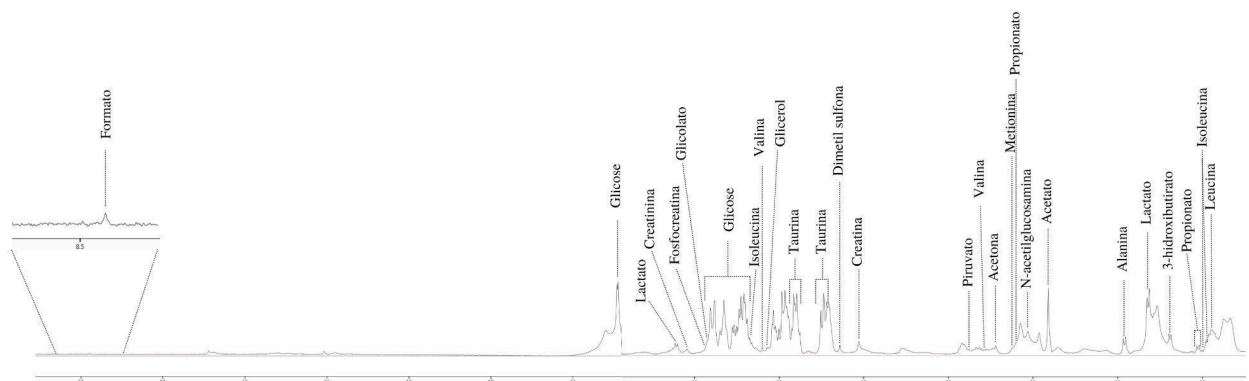
Em relação às concentrações séricas das enzimas FA e GGT, não houve diferença ( $p>0,05$ ) para GGT entre os tempos avaliados, sendo que os valores permaneceram dentro dos limites de referência de 6 a 32 UI/, descritos por Duncan et al. (1994). Em contrapartida, nos tempos 0 e 15 a FA foi maior em relação aos 43 e 71 dias de fornecimento da dieta, assim como foram maiores que os valores de referência de 143 a 395 U/L, descritos por Kaneko et al. (2008), e valores descritos por Inácio et. al (2018) em potros da raça Mangalarga Marchador, de 227,3 a 329,3UI/L. Quando são observadas concentrações séricas de GGT acima dos valores de referência, mesmo que esteja em muitos tecidos, essa alteração está primariamente relacionada com doenças hepáticas, especialmente nos ductos biliares (Kaneko et al., 2008). Entretanto, quando a GGT está dentro dos valores de referência e a FA encontra-se aumentada, significa que esta elevação está relacionada à presença de alterações dos tecidos ósseos. Em contrapartida, segundo Lewis (2000), as concentrações de FA têm pouco benefício para diagnóstico de alterações no metabolismo do cálcio, por flutuar de acordo com o consumo deste mineral. Desse modo, pode ser que os animais estavam sofrendo alterações dos tecidos ósseos nos tempos 0 e 15, porém, como os demais parâmetros estavam dentro dos valores de referência, a avaliação isolada da FA não deve ser considerada, sendo necessário avaliar outros parâmetros como por exemplo excreção fracionada de fósforo e cálcio (Kerber, 1999) e biópsia óssea (Puoli Filho, 1999).

Na tabela 4, é possível constatar também que houve diferença ( $p<0,05$ ) no ângulo da deformidade entre os tempos avaliados, sendo maior aos 71 dias de fornecimento da dieta. Segundo Trumble (2005) e Witte & Hunt (2009), potros alimentados com dietas desbalanceadas em minerais podem desenvolver deformidades angulares dos membros. Thomassian (2005) descreveu que a gravidade da deformidade angular pode ser estabelecida de acordo com o grau da angulação mensurado. Assim, um desvio com angulação de 0 a 2 graus, pode ser classificado como discreto; de 2 a 4 graus moderado; de 4 a 8 graus grave; e mais que 8 graus o desvio é severo. No presente estudo, ao final da etapa experimental (71 dias), os animais apresentaram 4,31° de desvio angular, considerado, na escala proposta por Thomassian (2005), como desvio grave. No entanto, é necessário levar em consideração que os animais já apresentavam grau moderado de desvio angular antes do fornecimento das dietas e, além disso, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre o período inicial e final do experimento. Já em relação à variável índice cortical, não houve diferença ( $p<0,05$ ) entre os tempos avaliados. Segundo Lewis (2000) e Mendoza et al. (2017), para que seja radiograficamente evidente, seria necessária uma perda óssea significativa, cerca de 30%, o que possivelmente demandaria mais tempo de ingestão de oxalato associado ao desequilíbrio

nutricional. Desse modo, o consumo do capim elefante por 71 dias, como única fonte de forrageira, juntamente com concentrado balanceado com relações de Ca:P entre 2:1 e 6:1 parece não ter afetado nas variáveis radiográficas avaliadas (ângulo da deformidade e índice cortical).

O HNS pode ser desenvolvido pela ingestão de dieta com desequilíbrio na relação Ca:P, o que afeta a relação destes minerais no sangue. No presente estudo, não houve desequilíbrio nutricional, uma vez que as dietas foram formuladas para manter as relações Ca:oxalato e Ca:P nas dietas dentro dos valores recomendados pelo NRC (2007). Pode ser que com a existência de um grupo controle (ingestão apenas da forrageira com relação Ca:oxalato inadequada), ou com maior número de animais nos grupos experimentais formados ou, ainda, como um maior período experimental, essas diferenças esperadas seriam observadas. Entretanto, é importante ressaltar que, mesmo ingerindo diferentes concentrações de Ca na dieta (relação Ca:P 2:1, 3:1, 5:1 e 6:1), não houve diferença entre os grupos para nenhuma das variáveis avaliadas, o que pode ser indicativo de que altas concentrações de Ca na dieta não alteram o metabolismo desse mineral.

As análises metabolômicas mostraram o perfil metabólico de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P. A comparação dos espectros obtidos demonstrou que os animais apresentam



espectros com 22 metabólitos em comum (Figura 3 e Tabela 5).

Figura 3 – Espectro  $^1\text{H}$  geral de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P, com a identificação dos metabólitos presentes no soro.

Legenda: Os metabólitos estão identificados de acordo com seu deslocamento químico. Para efeito de melhor visualização a frequência referente à água, na região de 4.5 a 6.0 ppm foi

excluída. O pequeno espectro superior corresponde à magnificação da região aromática de 6.8 a 8.0.

Tabela 5. Metabólitos e seus respectivos deslocamentos químicos comuns ao soro de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P

METABÓLITO	Deslocamento químico (ppm)
3-Hidroxiacetato	1.1965; 2.2976; 2.4016; 4.1453
Alanina	1.4606; 3.7791
Acetato	1.9113
Acetona	2.2216
Creatina	3.0293; 3.9204
Creatinina	3.0332; 4.0459
Dimetil sulfona	3.1428
Formato	8.4476
Fosfocreatina	3.0311; 3.9395
Glicerol	3.5562; 3.64598; 3.7771
Glicolato	3.92455
Glicose	3.2378; 3.393; 3.4041; 3.4555; 3.4818; 3.5270; 3.7050; 3.7170; 3.7569; 3.8202; 3.8358; 3.8915; 4.6414; 5.2289
Isoleucina	0.9262; 1.0263; 1.2482; 1.4577; 1.9694; 3.6631
Lactato	1.3197; 4.1078
Leucina	0.9417; 0.9545; 1.6664; 1.6999; 1.7369; 3.7267
Metionina	2.1241; 2.1919; 2.6333; 3.8530
N-acetilglicosamina	2.0479; 3.4545; 3.7583; 3.8691; 4.7134; 5.1961; 8.0753
Piruvato	2.3805
Propionato	1.0185; 2.1132
Taurina	3.2383; 3.4141
Treonina	1.3202; 3.5818; 4.2514
Valina	0.9780; 1.0262; 2.2636; 3.6045

Por meio da análise por componentes principais (PCA) foi possível avaliar a variação dos metabólitos. A Figura 4 mostra a PCA para até a quinta dimensão. Nesta, observa-se claramente as variáveis que mais contribuíram para a variabilidade dos animais, sendo elas: propionato e valina na primeira dimensão, acetato e piruvato na segunda dimensão, peso vivo (PV) e PTH na terceira dimensão, FA na quarta dimensão e glicose na quinta dimensão.

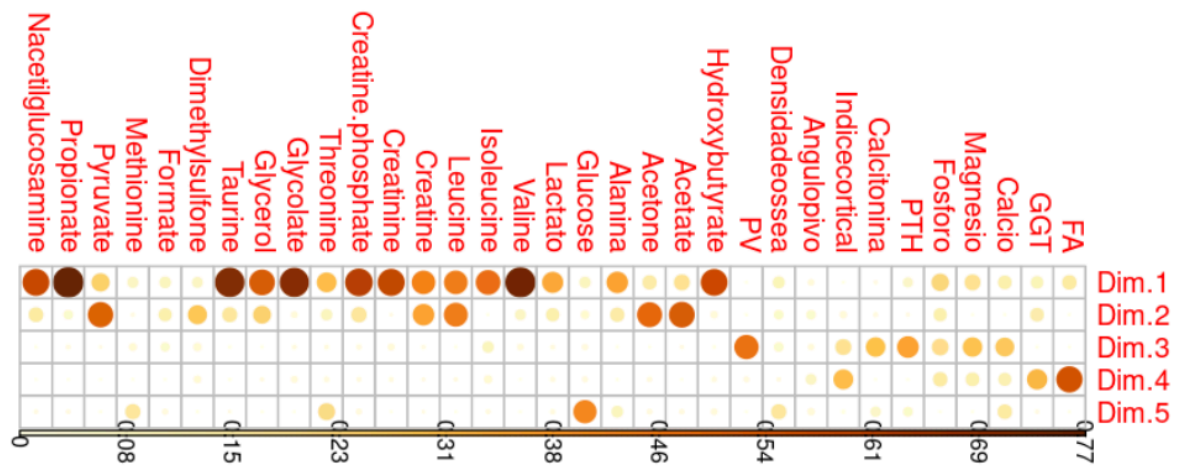


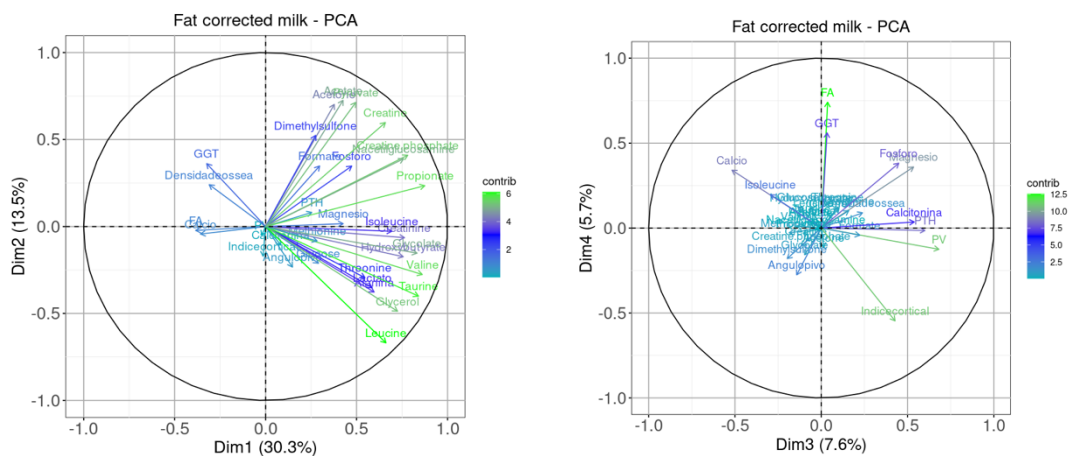
Figura 4. Gráfico de pesos para as variáveis fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT), cálcio, magnésio, fósforo, paratormônio (PTH), calcitonina, índice cortical, ângulo pivô, densidade óssea, peso vivo (PV), 3-hidroxibutirato, acetato, acetona, alanina, glicose, lactato, valina, isoleucina, leucina, creatina, creatinina, fosfocreatina, treonina, glicolato, glicerol, taurina, dimetilsulfona, formato, metionina, piruvato, propionato e N-acetilglicosamina que mais contribuíram para a variabilidade dos espectros de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P

Legenda: Quanto mais escuro e maior for o círculo maior a contribuição daquela variável para aquela dimensão.

Avaliando a Figura 4 verifica-se que potros durante a fase de crescimento apresentam o metabolismo energético aumentado (primeira, segunda e terceira dimensão). A glicose é a fonte primária de energia nos organismos e tem sua origem na quebra do glicogênio que ocorre na glicogenólise. A glicose (quinta dimensão) é sintetizada no fígado e rins a partir de intermediários não-carboidratos, como o piruvato e o glicerol, pelo processo conhecido como gliconeogênese (Berg et al, 2002). Da mesma forma, o acetato pode fornecer carbonos para a síntese de lipídios e o propionato é substrato gliconeogênico e contribui para o metabolismo

da glicose (Brandi e Furtado, 2009). Além disso, através da glicólise os aminoácidos, como a valina, são degradados, transformando-os em intermediários desta via por meio de reações específicas (Marzzoco e Torres, 2007).

Ainda na Figura 4 é possível também constatar que tanto o PTH (terceira dimensão) quanto a FA (quarta dimensão) poderiam ser utilizados como marcadores para diagnóstico da Osteodistrofia fibrosa em potros que estejam sofrendo deficiência de Ca. Quando os equinos ingerem gramíneas com altas concentrações de oxalato, a deficiência de Ca acontece porque esse mineral se liga ao oxalato no intestino delgado e forma um complexo insolúvel denominado oxalato de Ca (Puoli Filho et al., 1999), podendo levar ao HNS. Este distúrbio metabólico ocasionado pela redução da concentração sanguínea de cálcio (Ca) induz aumento na secreção de PTH para retirada deste mineral dos ossos visando manter a homeostase sanguínea. Já a FA é uma enzima que retira o P das proteínas e dos nucleotídeos e altas concentrações desta enzima são encontradas no fígado e nos ossos, portanto, elevações na dosagem sérica desta enzima ocorrem por alterações hepáticas, alta remodelação óssea ou metástases ósseas (Gueiros et al., 2011). Além disso, a PCA mostrou que com quatro componentes principais é possível descrever 57,1% dos dados, sendo 43,8% da variância total



descrita pela primeira e segunda componente principal, enquanto a terceira e a quarta componente principal explicaram 13,3% (Figura 5).

Figura 5. Mapa perceptual das variáveis (fosfatase alcalina, gama-glutamyltransferase, cálcio, magnésio, fósforo, paratormônio, calcitonina, índice cortical, ângulo pivô, densidade óssea, peso vivo, 3-hidroxi-butarato, acetato, acetona, alanina, glicose, lactato, valina, isoleucina, leucina, creatina, creatinina, fosfocreatina, treonina, glicolato, glicerol, taurina,

dimetilsulfona, formato, metionina, piruvato, propionato e N-acetilglicosamina) na primeira e segunda dimensão à esquerda e na terceira e na quarta dimensão à direita

De maneira geral, por comparação visual, grande parte dos picos dos metabólitos apresenta tendência ao aumento nos espectros de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P ao longo do experimento (Figura 6), sendo que as maiores concentrações foram observadas na glicose, taurina, acetato e lactato, respectivamente. No entanto, para os compostos alanina, metionina e treonina observou-se tendência à redução dos picos.

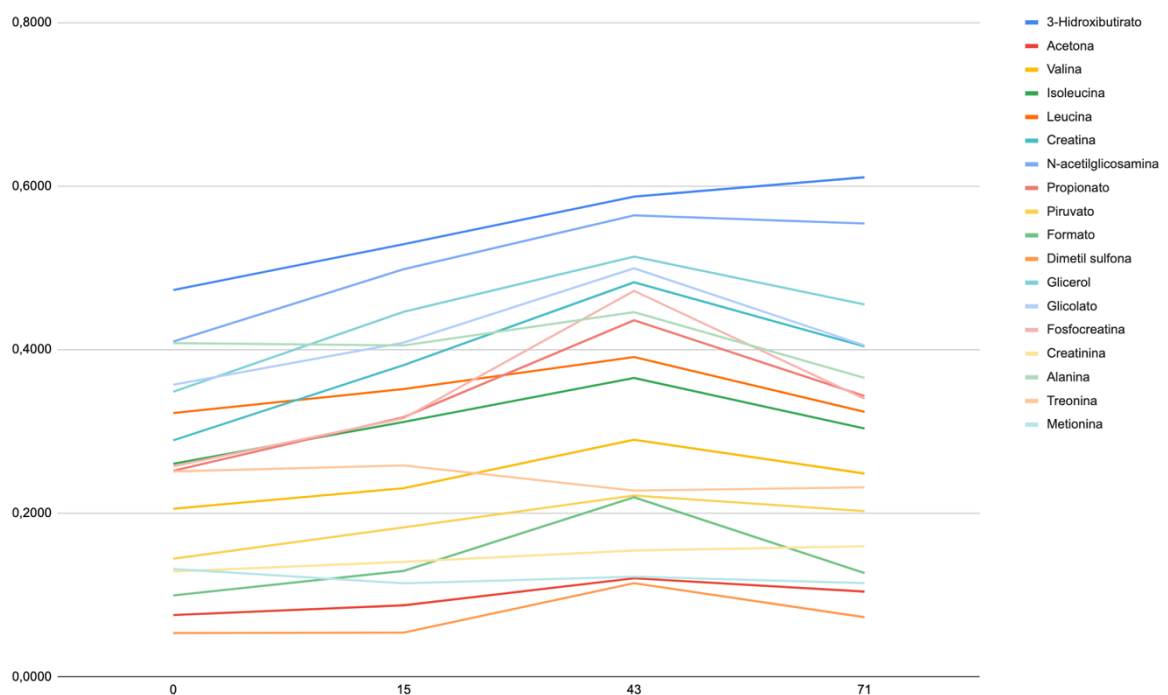


Figura 6. Concentrações séricas de 3-hidroxiacetato, acetona, valina, isoleucina, leucina, creatina, N-acetilglicosamina, propionato, piruvato, formato, dimetil sulfona, glicerol, glicolato, fosfocreatina e creatinina obtidas por meio de <sup>1</sup>H RMN aos 0, 15, 43 e 71 dias de fornecimento de gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P.

Os resultados obtidos por Ralston et al. (2009) confrontam com o presente estudo apresentando diferenças em relação às concentrações dos metabólitos encontrados. Os autores observaram no soro sanguíneo de potros de 1 ano de idade com OCD aumento dos metabólitos colina, tirosina, treonina, albumina, e beta-glucose, e redução de outros oito aminoácidos, lipoproteínas de baixa densidade e lipídios. Apesar de se tratar do mesmo

biofluido estudado e de uma doença osteoarticular, há diferenças no diagnóstico, etiopatogenia e sinais clínicos entre a OCD e o HNS. Em contrapartida, os resultados obtidos na análise metabólica do líquido sinovial na osteoartrite rende perfil metabólico com algumas semelhanças ao presente estudo. Para a osteoartrite, têm-se o aumento dos metabólitos 3-hidroxibutirato, acetato, acetona, alanina, citrato, creatina, creatinina, glicerol, glutamato, lactato, tirosina e grupo N-acetil. Além disso, alguns autores observaram redução inicial nas concentrações de glicose, com posterior aumento relacionado à severidade da doença (Naughton et al, 1993, Damyanovich et al, 1999a, Damyanovich et al, 1999b, Lacitignola et al, 2008). Sendo assim, o perfil metabólico da osteoartrite, assim como o observado no presente estudo, revela o ambiente acidótico, “hipoglicêmico” e hipóxico, com aumento do metabolismo anaeróbio, no qual a glicólise dá espaço para a lipólise como fonte de energia principal (Naughton et al, 1993, Damyanovich et al, 1999a, Damyanovich et al, 1999b, Lacitignola et al, 2008).

Até o presente momento não há estudos com avaliações por espectroscopia de <sup>1</sup>H RMN no soro de potros Mangalarga Marchador alimentados com gramínea rica em oxalato como única fonte forrageira. As pesquisas com a utilização desta técnica ainda são bastante escassas na Medicina Veterinária. Em equinos, existem apenas descrições da análise metabólica do líquido sinovial na osteoartrite e no soro de animais com OCD. Esta escassez justifica a necessidade do estabelecimento do padrão metabólico do soro de potros hípidos, pois pouco se sabe acerca do metabolismo em condições fisiológicas deste modelo animal. Espera-se que os resultados aqui contidos contribuam com as pesquisas existentes para futuras comparações entre indivíduos hípidos e indivíduos apresentando HNS.

Os achados no presente estudo mostram que o metabolismo energético está aumentado em potros durante a fase de crescimento

Além da determinação do perfil metabólico de animais hípidos, a identificação dos metabólitos presentes no soro de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea rica em oxalato como única fonte forrageira vem somar aos conhecimentos já estabelecidos para esta doença, auxiliando para o melhor entendimento do cenário presente no HNS.

Os resultados do presente estudo são dados preliminares e apresentam a técnica da <sup>1</sup>H RMN como um método vantajoso com relação às técnicas de determinação de biomarcadores, por demonstrarem o estado global e em tempo real da doença estudada. O completo significado de tais alterações será compreendido somente quando a cinética do influxo/clearance e síntese/quebra dos metabólitos relevantes em relação ao soro forem mais bem esclarecidos.

Alterações nos perfis metabólicos podem indicar progressão da doença em uma resolução muito superior às técnicas laboratoriais empregadas atualmente. A aplicação das tecnologias genômicas e metabolômicas poderá auxiliar na melhor compreensão da patofisiologia e progressão do HNS.

Atualmente, a técnica de <sup>1</sup>H RMN tem sido utilizada na rotina da medicina humana para avaliação e diagnóstico diferencial de diversos tumores, incluindo os de próstata e de ovário. No entanto, apesar do método descrito ainda não ser utilizado na rotina dos hospitais veterinários e considerando a alta sensibilidade deste tipo de técnica, esta avaliação poderia ser facilmente reproduzida em parceria com centros de pesquisa no qual o valor de análise do perfil metabólico de uma amostra estaria bem abaixo do custo de obtenção de kits específicos para um único marcador.

## 2.6. CONCLUSÃO

O consumo do capim elefante como única fonte de forrageira juntamente com concentrado balanceado com relação Ca:P entre 2:1 e 6:1, durante 71 dias, não interferiu no metabolismo do cálcio e nas variáveis radiográficas avaliadas (ângulo da deformidade e índice cortical).

A análise metabolômica identificou 22 metabólitos no soro de potros e mostrou aumento do metabolismo energético em potros durante a fase de crescimento .

Além da determinação do perfil metabólico de animais hípidos, a identificação dos metabólitos presentes no soro de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea rica em oxalato como única fonte forrageira vem somar aos conhecimentos já estabelecidos para o HNS, auxiliando para o melhor entendimento do cenário presente nesta doença.

## 2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Exploring proteins: Nuclear Magnetic Resonance can reveal the structures of protein solutions*. In: W. H. Freeman, Biochemistry, 5 ed. New York, 2002, p. 77-115.

BRANDI, R. A.; FURTADO, C. E. Importância nutricional e metabólica da fibra na dieta de equinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. SPE, p. 246-258, 2009.

CARVALHO, W. T. V. et al. Hay mineral composition of tifton 85 (*cynodon* spp.) dry in five ages of corte. Belo Horizonte. 52a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2015.

- CURCIO, B. R.; LINS, L. A.; BOFF, A. L. N. et al. Osteodistrofia fibrosa em equinos criados em pastagens de *Panicum maximum* cultivar Aruana: relato de casos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.1, p.37-41, 2010.
- DAMYANOVICH, A. Z.; STAPLES, J. R.; CHAN, A. D. M.; MARSHALL, K. W. Comparative study of normal and osteoarthritic canine synovial fluid using 500 MHz <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 17, p. 223-231, 1999a.
- DAMYANOVICH, A. Z.; STAPLES, J. R.; MARSHALL, K. W. <sup>1</sup>H NMR investigation of changes in the metabolic profile of synovial fluid in bilateral canine osteoarthritis with unilateral joint denervation. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.7, p. 165-172, 1999b.
- DUNCAN, J.R.; PASSE, K.W.; MAHAFFEY, E. A. *Veterinary laboratory medicine: Clinical Pathology*. 3ed. IOWA STATE UNIVERSITY. 1994
- ESTEPA, J.C.; GARFIA, B.; GAO, P.R. et al. Validation and clinical utility of a novel immunoradiometric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone in the horse. *Equine Veterinary Journal*, v. 35, p. 291–295, 2003.
- ESTEPA, J.C.; AGUILERA-TEJERO, E.; ZAFRA, R. et al. An unusual case of generalized soft-tissue mineralization in a suckling foal. *Veterinary Pathology*, v.43, p.64-67, 2006.
- GRACITELLI, M. E. C.; VIDORIS, A. A. C.; LUBA, R. et al. Paratormônio e Osteoporose: Encontrando o fio da meada. Bases fisiológicas para utilização do PTH no tratamento da osteoporose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, vol. 46, n. 3, p. 215-220, 2002.
- GUEIROS, J. E. B.; HERNANDES, F. R.; KAROHL, C.; JORGETTI, V. Prevenção e tratamento do hiperparatireoidismo secundário na DRC. *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 33, n. 2, p. 189-247, 2011.
- GUYTON, A.C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1173 p.
- INÁCIO, D. F. S.; REZENDE, A. S. C.; MELO, M. M. et al. Effect of Supplementation of Sorghum Silage in Weanling Fillies During the Dry Period in Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 68, p. 88-93, 2018.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6 ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. 916p
- KERBER, Claudia Ehlers. Métodos para avaliação da mineralização óssea de eqüinos em crescimento. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 2, n. 1, p. 17-25, 1999.

- KIENZLE, E.; ZORN, N. (2006, March). *Bioavailability of minerals in the horse*. In: Proceedings of the 3rd European Equine Nutrition & Health Congress. Merelbeke, 2006. p. 27-36.
- LACITIGNOLA, L.; CROVACE, A.; FANIZZI, F.P.; FRANCIOSO, E. H NMR investigation of normal and osteo-arthritic synovial fluid in the horse. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, v. 21, p. 1-4, 2008.
- LACITIGNOLA, L. et al. Nutritional secondary hyperparathyroidism in two ponies. *Open Veterinary Journal*, v. 8, n. 2, p. 149-153, 2018.
- LEWIS, L. D. *Nutrição clínica eqüina: alimentação e cuidados*. São Paulo: Roca, 2000. 710 p.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica básica*. São Paulo: Guanabara Koogan, 2007, 3 ed, 360p.
- MENDOZA, F. J. Nutritional secondary hyperparathyroidism in equids: Overview and new insights. *Equine Veterinary Education*, v. 29, p. 558-563, 2017.
- NAUGHTON, D.; WHELAN, M.; SMITH, E.C. et al. An investigation of the abnormal metabolic status of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis by high field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS Letters)*, v.317, n.1/2, p.135-138, 1993.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient Requirements of Horses*. 6. Ed. Washington D.C. NRC, 2007. 341 p.
- PUOLI FILHO, J. N. P. et al. Suplementação mineral e mobilização de cálcio nos ossos de equinos em pastagem de *Brachiaria humidicola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 34, n.5, p. 873-878, 1999.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. et al. *Clínica veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- RALSTON, S.L.; PELCZER, I.; SHATYNSKI, C.; SPEARS, P.F. NMR-based metabonomic analysis of serum from standardbred yearlings with or without hock osteochondrosis desiccans lesions: preliminary study. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 29, n. 5, p. 385-386, 2009.
- REZENDE, A. S. C., SAMPAIO, I. B. M., LEGORRETA, G. L., MOREIRA, D. C. A. Effect of two different nutritional programs on orthopedic alterations in Mangalarga Marchador foals. *Journal of Equine Veterinary Science*, Wildomar, v. 20, n. 10, p.651-656, 2000.

REZENDE, A. S. C. A importância do sal mineral na nutrição dos equinos. *Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Pampa*, 2012.

THOMASSIAN, A. *Afecções do aparelho locomotor*. In: THOMASSIAN, A. *Enfermidades dos cavalos*. 4. ed. São Paulo: Varela, 2005. p. 96-136.

TRUMBLE, T. N. Orthopedic disorders in neonatal foals. *The Veterinary Clinics of North America Equine Practice*, v. 21, n. 2, p.357-385, 2005.

WITTE, S.; HUNT, R. A review of angular limb deformities. *Equine Veterinary Education*, v.21, p.378-387, 2009.

## ANEXOS

### ANEXO I - Formulação dos concentrados experimentais

Composição química	Concentrado experimental			
	% nos concentrados experimentais			
Alimento	2:1	3:1	5:1	6:1
Milho triturado	63	63	63	63
Farelo de soja	25	25	25	25
Fosfato Bicálcico	1,2	1,2	1,2	1,2
Calcário Calcítico	1,4	3,3	7,0	9,0
Caulim	9,4	7,5	3,8	1,8
TOTAL	100	100	100	100

### ANEXO II – Radiografias de potros Mangalarga Marchador recebendo gramínea com baixa relação Ca:oxalato e concentrado com diferentes relações de Ca:P

