

RODRIGO MARTINS RIBEIRO

**RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE INDUZIDA E LAMINITE ENDOCRINOPÁTICA EM
EQUINOS MANGALARGA MARCHADOR: ASPECTOS CLÍNICOS,
LABORATORIAIS, MORFOMÉTRICOS E PATOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor na área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Rafael Resende Faleiros.

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2017**

R484r

Ribeiro, Rodrigo Martins, 1980-

Relação entre obesidade induzida e laminite endocrinopática em equinos
Mangalarga Marchador: aspectos clínicos, laboratoriais, morfométricos e patológicos /
Rodrigo Martins Ribeiro. — 2017.

153 p. : ii.

Orientador: Rafael Resende Faleiros

Tese (doutorado) — Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Cavalo marchador — Doenças — Diagnóstico — Teses. 2. Obesidade — Teses.
3. Laminite — Teses. 4. Distúrbios do metabolismo — Teses. I. Faleiros, Rafael
Resende. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

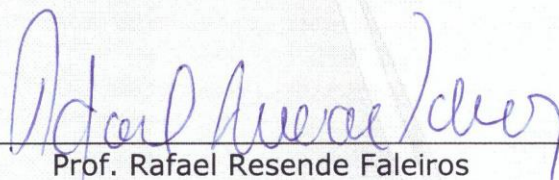
CDD - 636.108 967

FOLHA DE APROVAÇÃO

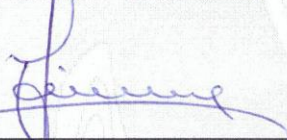
RODRIGO MARTINS RIBEIRO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 03 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



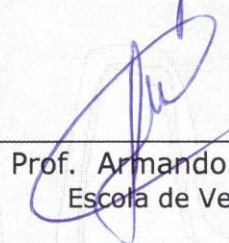
Prof. Rafael Resende Faleiros
Presidente - Orientador



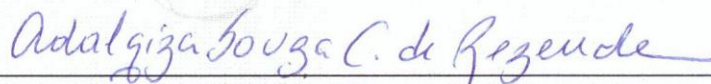
Dr. Leonardo Rodrigues de Lima
Hospital Veterinário Estrada Real - JF



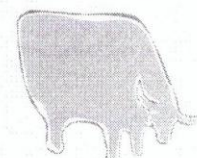
Prof. Luiz Claudio Nogueira Mendes
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP



Prof. Armando de Mattos Carvalho
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Adalgiza Souza Carneiro de Rezende
Escola de Veterinária - UFMG





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 49 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Relação entre obesidade e laminite em equinos: aspectos clínicos, laboratoriais, morfométricos e patológicos", que tem como responsável Rafael Resende Faleiros, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 09/04/2014. Este certificado espira-se em 09/04/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 49 / 2014, related to the Project entitled "Relationship between obesity and laminitis in horses: clinical, laboratorial, morphometric and pathological aspects", under the supervision of Rafael Resende Faleiros, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/04/2014. This certificates expires in 09/04/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 09/04/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue ...”

Martin Luther King

À minha Esposa,
Filho e meus Pais

Debora da Silva Freitas Ribeiro

Gabriel Freitas Ribeiro

Altair Alves Ribeiro e

Nadir de Melo Martins Ribeiro

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo em todos os momentos da minha vida.

A minha família, por me apoiar e incentivar.

A Débora, minha esposa, pelo companheirismo, paciência, dedicação e à qual me deu um filho sem igual.

Ao Gabriel, meu filho, que a cada dia que passamos juntos me ensina que toda novidade e surpresa que ele vivência, mesmo que sejam coisas do cotidiano, é mais interessante e mágico do que parece, me fazendo abrir os olhos para as coisas simples da vida.

Ao Prof. Dr. Rafael Resende Faleiros, pela orientação, amizade e conhecimento transmitido.

Aos professores Doutores Geraldo Eleno Silveira Alves e Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso por sua orientação e conhecimento transmitido.

À CNPQ, CAPES e FAPEMIG pelo financiamento do experimento.

Ao Departamento de Pós-Graduação de Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, por me aceitar no curso de doutorado.

A todos os estagiários e ICs, em especial, Letícia, Davi e a Lin.

A “família” da Pós, da UFMG, Ana Flávia, Filipe, Heloisa Pedroza, Jaci, Lilian, Marina, Raquel, Julia ...

Aos meus “irmãos” do doutorado, Cahue, Serginho, Odael, Rodrigo Valadares, Álvaro, Heloisa Falcão, Jéssica, Patricia e Mayara com os quais convivi e aprendi.

Aos cavalos que sem eles não teríamos um objetivo e o prazer de trabalhar.

SUMÁRIO

RESUMO	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO GERAL	20
2. OBJETIVOS	21
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. HIPÓTESE	22
CAPÍTULO 1	23
SÍNDROME METABÓLICA EQUINA: REVISÃO DE LITERATURA	23
1. INTRODUÇÃO	23
2. SÍNDROME METABÓLICA EQUINA (SME)	23
3. OBESIDADE	25
3.1. AVALIAÇÃO DO GRAU DE OBESIDADE	26
3.2. ACÚMULO DE ADIPOSIDADE LOCALIZADA	28
4. INSULINA	30
4.1. SÍNTESE E SECREÇÃO DA INSULINA	30
4.2. AÇÕES E EFEITOS DA INSULINA	31
4.3. RESISTÊNCIA À INSULINA (RI)	32
4.4. DESREGULAÇÃO DA INSULINA	35
4.5. DIAGNÓSTICO	36
4.5.1. MENSURAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INSULINA BASAL	36
4.5.2. INDICADORES INDIRETOS (PROXIES) COM BASE NAS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE GLICOSE E INSULINA BASAIS	37
4.5.3. TESTES DINÂMICOS	38
5. BIOMARCADORES METABÓLICOS	41
5.1. PRESSÃO ARTERIAL (PA)	42
5.2. METABOLISMO LIPÍDICO	44
5.2.1. LIPOPROTEÍNAS	44
5.2.2. METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS	45
5.2.3. METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS NO FÍGADO	46
5.2.4. LDL e HDL	46
5.2.5. DISLIPIDEMIAS NA SME	47
6. LAMINITE EM EQUINOS	48

6.1.	LAMINITE ENDOCRINOÁTICA EM EQUINOS	50
6.1.1.	LAMINITE ASSOCIADA AOS GLICOCORTICOIDES	50
6.1.2.	LAMINITE ASSOCIADA A SME.....	51
6.1.3.	ALTERAÇÕES DA ARQUITETURA LAMELAR DO CASCO COM LAMINITE ENDOCRINOPÁTICA.....	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO 2.....		74
ALTERAÇÕES DOS BIOMARCADORES E CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE EQUINOS COM OBESIDADE INDUZIDA		74
RESUMO		74
ABSTRACT.....		75
1.	INTRODUÇÃO	76
2.	MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1.	ANIMAIS.....	77
2.2.	DIETA PARA INDUÇÃO DE OBESIDADE.....	78
2.3.	AValiação CLÍNICA.....	79
2.4.	DETERMINAÇÃO DO ESCORE CORPORAL (ECC) E MENSURAÇÃO DE VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS DA DEPOSIÇÃO DE GORDURA REGIONAL	80
2.5.	COLETA DO MATERIAL.....	82
2.6.	ANÁLISES DOS BIOMARCADORES	83
2.7.	INDICADORES MATEMÁTICOS (PROXIES)	84
2.8.	Teste de Baixa Dose de Glicose Oral (TBDGO)	84
2.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
3.	RESULTADOS.....	85
4.	DISCUSSÃO.....	91
5.	CONCLUSÃO	97
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
CAPÍTULO 3.....		105
RELAÇÃO ESPACIAL ENTRE A FALANGE DISTAL E O ESTOJO CórNEO EM EQUINOS COM OBESIDADE INDUZIDA		105
RESUMO		105
ABSTRACT.....		106
1.	INTRODUÇÃO	106
2.	MATERIAL E MÉTODOS	107
2.1.	ANIMAIS.....	107

2.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	107
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	108
3. RESULTADOS	108
4. DISCUSSÃO	112
5. CONCLUSÃO	115
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
CAPÍTULO 4	119
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO LAMELAR EM EQUINOS COM OBESIDADE INDUZIDA	119
RESUMO	119
ABSTRACT	120
1. INTRODUÇÃO	120
2. MATERIAL E MÉTODOS	121
2.1. COLETA DA BIÓPSIA	121
2.2. ANÁLISE DAS AMOSTRAS	122
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	128
3. RESULTADOS	128
4. DISCUSSÃO	132
5. CONCLUSÃO	135
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
CAPÍTULO 5	137
CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS DE ADIPOSIDADE, BIOMARCADORES DE DISFUNÇÃO METABÓLICA E PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS DO TECIDO LAMELAR EM EQUINOS COM OBESIDADE INDUZIDA	137
RESUMO	137
ABSTRACT	138
1. INTRODUÇÃO	138
2. MATERIAL E MÉTODOS	139
2.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA	139
3. RESULTADOS	140
4. DISCUSSÃO	145
5. CONCLUSÃO	149
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
7. CONCLUSÃO GERAL	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Demonstração das características físicas utilizando a escala de escore de condição corporal (ECC) segundo Henneke et al., 1983.....	27
Tabela 2: Composição bromatológica aproximada do concentrado (Guabi Equitage Laminados®), e do feno experimental (Cynodon dactylon (L.) Pers.Var. “Coast cross”) e seus respectivos ingredientes utilizados durante o período experimental.	79
Tabela 3: Método de classificação de claudicação em equinos da American Association of Equine Practitioners (AAEP, 1996).	80
Tabela 4: Médias e desvios-padrão de peso, escore de condição corporal (ECC) segundo Henneke et al. (1983) e escore da crista de pescoço (ECP) segundo Frank et al., (2006) de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade.....	85
Tabela 5: Médias e desvios-padrão de mensuração da circunferência do pescoço (MCP), mensurando as 25, 50 e 75% da distância entre a nuca e a cernelha de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade.	86
Tabela 6: Médias e desvios-padrão da pressão arterial média (PA) e as medidas de espessura do tecido adiposo localizado na base da cauda através do uso de exame ultrassonográfico (UBC) de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade e os valores de referência para a PAM e VLDL-s.....	86
Tabela 7: Médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos de triglicérides (TRI), LDL-c e HDL-c de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade e seus respectivos valores de referência.....	87
Tabela 8: Médias e desvios-padrão valores plasmáticos de colesterol e dos ácidos graxos não esterificado (AGNE) de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade e seus respectivos valores de referência.	87
Tabela 9: Médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos de glicose, frutamina e insulina de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade e seus respectivos valores de referência.....	88
Tabela 10: Médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos dos “proxies” de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade.....	89
Tabela 11: Médias e desvios-padrão das áreas sob a curva relativas às concentrações plasmáticas de insulina e glicose após a administração gástrica de glicose (0,25 g/kg) em equinos Mangalarga Marchador antes, 90 e 150 dias após a indução da obesidade.	91

Tabela 12: Médias e seus respectivos desvios padrões (DP), as variáveis foram obtidas pela avaliação radiográfica do estojo córneo dos membros torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de equinos mestiços da raça manga-larga marchador submetidos indução da obesidade.....	110
Tabela 13: Médias e seus respectivos desvios padrões (DP), as variáveis foram obtidas pela avaliação radiográfica do estojo córneo dos membros torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de equinos mestiços da raça manga-larga marchador submetidos indução da obesidade.....	111
Tabela 14: Médias e desvios-padrão do comprimento e da ocorrência (1 a 10) de diferentes formatos das lâminas epidermais primárias de equinos, antes e após indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$	129
Tabela 15: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes formatos da porção abaxial das lâminas epidermais primárias de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$	129
Tabela 16: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes formatos da porção axial das lâminas epidermais primárias de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$	129
Tabela 17: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes classificações do de tecido epidérmico em ponte com a lâmina dérmica primária (LDP) em sua porção axial de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$	130
Tabela 18: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes classificações do tipo de ilhas epiteliais nas lâminas dérmicas primárias (LDP) em sua porção axial de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$	130
Tabela 19: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes graus de queratinização da região axial nas lâminas dérmicas primárias (LDP) de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$	130
Tabela 20: Médias e desvios-padrão do comprimento e da ocorrência (1 a 10) de diferentes formatos das lâminas epidermais secundárias, nas porções axial, intermédia e axial das lâminas primárias, de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$	131
Tabela 21: Índices de correlações significativos entre variáveis de obesidade e biomarcadores plasmáticos em equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias.	140
Tabela 22: Índices de correlações significativos entre valores de proxies e biomarcadores e UBC em equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias.	141

Tabela 23: Índices de correlações significativos entre variáveis de obesidade e alterações histológicas do tecido lamelar em equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias..... 142

Tabela 24: Índices de correlações significativos entre valores de proxies e variáveis histológicas do tecido lamelar do casco de equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias..... 143

Tabela 25: Índices de correlações significativos entre concentrações plasmáticas de glicose, frutossamina e frações de colesterol e variáveis histológicas do tecido lamelar do casco de equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias..... 144

Tabela 26: Índices de correlações significativos de concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total, AGNE e insulina com variáveis histológicas do tecido lamelar do casco de equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias. 145

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Imagens demonstrando o ECC seguindo a escala de Henneke et al., 1983, modificado de Faleiros, 2002..... 28
- Figura 2: Ilustração dos escores de deposição de gordura na crista do pescoço (ECP). Adaptado de Frank et al 2006. 81
- Figura 3: Ilustração do procedimento usado na mensuração do escore da circunferência do pescoço (ECP), considerando três pontos iniciais: 25% (A), 50% (B) e 75% (C) da distância do topo da cabeça até o topo da cernelha (Distância X). Adaptado Frank et al., 2006. 82
- Figura 4: Ilustração do procedimento utilizado para a mensuração da deposição de gordura na base da cauda por meio de exame ultrassonográfico da base da cauda (UBC). A: demonstração da localização do transdutor do aparelho de ultrassonografia. B: demonstração da imagem obtida do aparelho de ultrassom com a mensuração de 3 pontos da camada de gordura subcutânea. 82
- Figura 5: Ilustração do procedimento utilizado para a mensuração da pressão arterial média (PAM). A: demonstração do monitor multiparamétrico. B: demonstração da localização do manguito. 84
- Figura 6: Médias e erros-padrão das concentrações plasmáticas de insulina após a administração gástrica de glicose (0,25 g/kg) em equinos Mangalarga Marchador antes, 90 e 150 dias após a indução da obesidade. Legenda: # Valores significativos em r Valores significativos em relação aos resultados do tempo Anterior, ¥ Valores significativos em relação aos resultados do tempo Anterior e 90 dias. 90
- Figura 7:: Médias e erros-padrão das concentrações plasmáticas de glicose após a administração gástrica de glicose (0,25 g/kg) em equinos Mangalarga Marchador antes (Controle), 90 e 150 dias após a indução da obesidade. Legenda: # Valores significativos em relação aos resultados do tempo Anterior, ¥ Valores significativos em relação aos resultados do tempo Anterior e 90 dias, £ Valores significativos em relação aos valores dos resultados do tempo 150 e 90 dias. 90
- Figura 8: Imagens demonstrando as mensurações realizadas em cascos de membros torácicos os animais utilizados neste experimento por meio do Software Metron Hoof Pro. 1: Ângulo palmar, 2: ângulo palmar da Falange distal, 3: Ângulo da quartela, 4: ângulo da articulação interfalângica proximal (Interf. Prox.), 5: ângulo da articulação interfalângica distal (Interf. Dist.), 6: eixo entre o casco e quartela, 7: suporte do casco, 8: Breakover, 9: Espessura da sola, 10: CF proximal, 11: CF distal, 12: Afundamento, 13: comprimento da falange média, 14: Comprimento da quartela, imagem modificada de Drumond et al., 2016..... 108
- Figura 9: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), através do aumento 2x. Demonstração da técnica utilizada para a mensuração do comprimento das LEP e as divisões utilizadas para a análise histomorfométrica e sua categorização, seguindo a metodologia utilizada por Karikoski et al., 2014 . LEP: Lâmina epidermal primária, LDP: Lâmina dérmica primária..... 123

Figura 10: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), através do aumento 2x. Demonstração da técnica utilizada para a mensuração as características morfológicas das LEP, 1: padrão (reto), seta demonstrando o sinal de uma curva, 2: LEP com uma bifurcação, seguindo a metodologia utilizada por Karikoski et al., 2014. 124

Figura 11: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstração a técnica utilizada para a demonstrar a análise morfológica da região abaxial da LEP, A: padrão, B: cônico, C: afiado, D: bifurcado, imagem modificada de Karikoski et al., 2014. 125

Figura 12: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas, demonstração a técnica utilizada para análise morfológica da região axial da LEP, A: padrão, B:afiado, C: bifurcado, D: separada, E: proliferativa, F: queratinizado, imagem modificada de Karikoski et al., 2014. 126

Figura 13: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstração a técnica utilizada análise do grau de queratinização da região abaxial da LEP. A: normal, B: ligeiramente aumentado, C: moderadamente aumentado, D: aumento acentuado, E: técnica utilizada para mensurar o comprimento da queratinização da LEP, seguindo a metodologia utilizada por Karikoski et al., 2014. 127

Figura 14: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstração a técnica utilizada para análise das características morfológicas da LES. A: padrão, B: cônico, C: clava, D: hiperplasia da camada suprabasal (HCS), E: bifurcado, F: fundida, imagem modificada de Karikoski et al., 2014. 128

LISTA DE ABREVIATURAS

1 - 11β - HSD - 11β - Hidroxiesteróide Desidrogenase
aa - Aminoácido
ACAT - Acil Colesterol-Acil Transferase
ACTH - Adrenocorticotropina
ACVIM - American College of Veterinary Internal Medicine
AGE - Advanced Glycation End-products
AGNE - Ácidos Graxos Não Esterificados
AIR_g - Acute Insulin Response
APOS - Apoproteínas
CETO - Cholesterol Ester Transfer Protein
DI - Desregulação Insulínica
DPPI - Disfunção da Pituitária Pars intermedia
ECC - Escore de Condição Corporal
ECP - Escore da Circunferência do Pescoço
ET-1 - Endotelina 1
FNT- α - Fator de Necrose Tumoral alfa
G:I - relação entre a Glicose com a Insulina
GC - Glicocorticóides
GLUT - Receptor de Transporte de Glicose
HDL - high Density Lipoprotein
HOMA - Modelo de avaliação de homeostase
HSL - Hormônio Sensível a Lipase
IGF -1R - Insulin-like Growth Fator - 1 receptor
IGF-1 - Insulin-like Growth Fator - 1
IL-1 - Interleucinas 1
IL-6 - Interleucina 6
InsR - Receptor de insulina
LCAT - Lecitina-Colesterol-Aciltransferase
LDL - Low Density Lipoprotein
LPL - Lipoproteína Lipase
MAPK - Mítogen Activated Protein Kinases
MB - Membrana Basal
MCP-1 - Monocyte Chemoattractant Protein- 1
MEC - Proteínas de Matriz Extracelular
MIF - Macrophage Innibitory Factor
MIRG - Modifies Insulin to Glucose Ratio
MMP-9 - Matriz Metaloproteinase 9
MTO - Microsomal Triglyceride Transfer Protein
NO - Nitric Oxide
PA - Pressão Arterial
PAI-1 - Plasminogen Activator Inhibitor 1
PI3K - Fosfatidilinositol 3-Quinase
RI - Resistência à Insulina
RISQI - Reciprocal of the Inverse Square os basal Insulin concentration
ROS - Reactive Oxygen Species
SAA - erum Amyloid A
SI - Sensibilidade à Insulina

SME – Síndrome Metabólica Equina

SNC – Sistema Nervoso Central

TBDGO - Teste de Baixa Dose de Glicose Oral

TCGI - Teste Combinado de Glicose-Insulina

TLR – Toll Like Receptor

TRGI - Teste de Resposta Glicêmica à Insulina

TTGIV - Teste de Tolerância à Glicose Intravenosa

TTGO - Teste de Tolerância à Glicose Oral

TTI - Teste de Tolerância à Insulina

VLDL – Very Low Density Lipoprotein

RESUMO

A Síndrome Metabólica Equina (SME) se caracteriza por ser um distúrbio metabólico associado à obesidade que predispõe os cavalos à laminite, tendo como ponto central a resistência à insulina. A grande maioria dos cavalos e pôneis afetados pela SM apresentam o quadro de obesidade generalizada ou regional. Entretanto, nem todos os cavalos com SME são obesos e nem todos os animais obesos desenvolvem a desregulação insulínica (DI). A laminite originária da SME tem como principal característica ter um perfil subclínico, com importantes alterações nas estruturas do casco, antes mesmo de apresentar sintomas. O objetivo desta Tese foi estudar as alterações metabólicas provocadas pela obesidade em equinos, correlacionando-as com alterações teciduais e morfométricas dos cascos através da indução do ganho de peso com a finalidade de obter ferramentas para a realização de um diagnóstico precoce para a SME. Foram utilizados 9 equinos adultos entre eles 4 machos castrados e 5 fêmeas, com escore corporal (ECC) inicial médio (\pm DP) de $2,9 \pm 1$, esses animais foram submetidos a uma dieta hipercalórica para a indução do ganho de peso durante um período experimental de 150 dias, atingindo o ECC de $8,3 \pm 1$. Para a avaliação das variáveis plasmáticas em intervalos de 15 dias foram utilizadas amostras de sangue de origem venosa para a mensuração dos valores de HDL-c, LDL-c, VLDL-c, AGNE, frutossamina, glicose, colesterol e triglicérides. Para a avaliação da condição corporal foi mensurada em intervalos de 15 dias o peso dos animais, o escore corporal, o acúmulo de tecido adiposo na região da crina, o acúmulo de gordura na base da cauda com o uso de ultrassonografia e com o uso de fita métrica foi aferida a circunferência do pescoço em três pontos pré-definidos com 25, 50 e 75% em relação à medida do comprimento. Para a análise histopatológica foram coletados os dados antes e após 150 dias da indução da obesidade, as amostras para a análise histopatológica foram obtidas com a realização de biópsia da parede dorsal do casco. Para a análise radiográfica foram coletados os dados antes do fornecimento da indução da obesidade e a cada 30 dias durante o período experimental, os dígitos foram radiografados na projeção lateromedial, após a digitalização das imagens foi utilizado o programa computacional Metron Hoof. Os resultados do presente estudo sinalizaram que o MCP 50% e a UBC demonstraram o acúmulo de gordura regional primeiro, mas o ECP e as MCP 25% e 75% também evidenciaram o acúmulo de gordura de maneira conjunta, mas de forma tardia. Entre os biomarcadores o LDL-c, HDL-c, o colesterol e a insulina apresentaram valores significativos. Os proxies e o TBDGO manifestaram resistência à insulina compensada. Os exames radiográficos e histopatológico revelaram que a terceira falange modificou seu arranjo espacial no estojo córneo e apresentou modificações morfológicas no tecido laminar. Levando à conclusão de que durante o período de ganho de peso os animais desenvolvem modificações metabólicas e morfológicas do casco, comprovando que é necessário fazer um acompanhamento clínico criterioso em animais obesos, mesmo sem a presença de sintomas.

Palavras Chave: Biomarcador, Biópsia, Laminite endocrinopática, Resistência à insulina, Síndrome Metabólica Equina.

ABSTRACT

Equine Metabolic Syndrome (EMS) is characterized by being a metabolic disorder associated with obesity that predisposes horses to laminitis, with the central point being insulin resistance. The great majority of horses and ponies affected by MS present generalized or regional obesity. However, not all horses with EMS are obese and not all obese animals develop insulin deregulation (ID). Other phenotypic components that may be associated with EMS, such as the upregulation of inflammatory indicators, propensity to develop arterial hypertension, infertility, hypertriglyceridemia and hyperleptinemia have been proposed. Laminitis originating from EMS has as main characteristic to have a subclínica profile, with important alterations in the structures of the hoof, before even presenting symptoms. The objective of this thesis was to study the metabolic alterations caused by obesity in equines, correlating them with tissue and morphometric alterations of the hooves through the induction of weight gain in order to obtain tools for an early diagnosis for EMS. A total of 9 adult horses, 4 castrated males and 5 females, with mean initial body score (\pm SD) of 2.9 ± 1 , were submitted to a hypercaloric diet for the induction of weight gain during one Experimental period of 150 days, reaching ECC of 8.3 ± 1 . Blood samples of venous origin were used to evaluate the plasma variables at 15-day intervals for the measurement of HDL-c, LDL-c, VLDL-c, NEFA, fructosamine, glucose, cholesterol and triglycerides. Body weight was measured at 15-day intervals for body weight, adipose tissue accumulation in the horsehair region, fat accumulation at the base of the tail with the use of ultrasonography and the use of Measure tape was measured at the circumference of the neck at three predefined points with 25, 50 and 75% relative to the length measurement. For the histopathological analysis data were collected before and after 150 days of obesity induction, the samples for the histopathological analysis were obtained with a biopsy of the dorsal wall of the hoof. For the radiographic analysis, the data were collected prior to the supply of obesity induction and every 30 days during the experimental period, the digits were radiographed in the lateromedial projection, after the scanning of the images, the Metron Hoof computer program was used. The results of the present study indicated that 50% MCP and UBC demonstrated regional fat accumulation first, but ECP and 25% and 75% MCP also showed fat accumulation together, but late. Among the biomarkers, LDL-c, HDL-c, cholesterol and insulin presented significant values. Proxies and TBDGO showed resistance to compensated insulin. The radiographic and histopathological exams revealed that the third phalanx modified its spatial arrangement in the corneal case and presented morphological modifications in the lamellar tissue. We conclude that during the period of weight gain the animals develop metabolic and morphological modifications of the hoof, proving that it is necessary to follow a clinical criterion in obese animals even without the presence of symptoms.

Keywords: Biomarkers, Biopsy, Endocrinopathic laminitis, Equine Metabolic Syndrome, Insulin resistance.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é quarto país em número de equinos do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América, China e México (FAO, 2011). O último censo realizado pelo IBGE no ano de 2012, demonstrou que o Brasil possui 5.363.185 equinos, 902.716 asininos e 1.221.756 muaras, distribuídos em todas regiões do país, sendo que aproximadamente 1.100.000 de equinos são utilizados para o esporte e cerca de 3.900.000 de animais para o trabalho (IBGE, 2012, Lima, Cintra, 2015).

Em adição ao destaque quanto ao número de equinos que o Brasil possui, o agronegócio equino é responsável pelo emprego direto e indireto de aproximadamente 3,2 milhões de pessoas, a equinocultura origina rendimentos nas áreas econômicas de sela, carga e tração, também desempenha papéis sociais como no esporte, lazer e equoterapia. Criando um complexo de agronegócio como fornecedores de insumos, produtos e serviços para a criação, garantindo com medicamentos, rações, selas e acessórios. Junto a isso o agronegócio de equinos também oferece serviços de ferrageadores, veterinários, treinadores, transporte animal, ensino e pesquisa (Lima et al., 2006, Lima e Cintra, 2015).

Ante a sua importância o agronegócio equino originou cerca de R\$ 16,15 bilhões no ano de 2015, empregando diretamente cerca de 607.329 pessoas e criando até 2.429.316 empregos indiretos. O segmento esportivo é responsável por empregar diretamente cerca de 125.700 pessoas, acarretando valores na ordem de R\$ 6,5 bilhões por ano. No ano de 2015 a renda gerada com exportação e importação de cavalos vivos foi de aproximadamente R\$ 8,9 milhões e o comércio de carne de equinos brasileiro gerou o valor equivalente de R\$ 80 milhões (Lima e Cintra, 2015).

Com esse potencial econômico, é necessário evitar perdas econômicas e esportivas, criando melhores condições de sanidade e manejo dos animais, objetivando um melhor desempenho. A principal causa de inatividade atlética em equinos são as afecções nos membros locomotores, sendo responsável por acometer entre 35,8 a 51,9% entre as causas que levam a perda de performance em equinos (Alves et al., 2007, Rosedale et al., 1985, Stashak, 1996).

As claudicações são as principais causas de prejuízo em cavalos Puro Sangue Inglês, sendo responsável pela perda de até 45% dos dias de treinamento dos animais, causando um prejuízo financeiro de até US\$ 23.000 por cavalo por temporada de treinamento (Hernandez e Hawkins, 2001).

Mediante a esses fatos, um dos grandes causadores de claudicação em cavalos é a laminite, tendo como consequência a rotação e deslocamento ventral da falange distal (Baxter, 1994). A laminite é uma afecção que acomete os cascos dos equinos sendo basicamente uma inflamação das lâminas sensitivas responsáveis pela união entre a muralha e a falange distal (Moore et al., 1989).

Em um estudo que avaliou a presença de achados patológicos consistentes de laminite crônica em 1119 fôsseis de equídeos, datados de até 3,5 milhões de anos, foi observado que em 75,25% dos fôsseis analisados possuíam lesões consistentes à laminite crônica, demonstrando que essa patologia sempre esteve presente nesta espécie (Wallett, 2013).

Acredita-se que 15% da população de equinos será acometida por laminite ao longo de suas vidas, sendo que 75% desses animais podem desenvolver claudicação crônica ou severa, podendo levar a perdas econômicas no valor estimado de US\$ 8 milhões ao ano (Stokes, 2003). Segundo Pollitt

(2001) a laminite é a segunda maior causa de morte em equinos, ficando atrás somente da síndrome cólica. Podendo inviabilizar até 75% dos animais acometidos com laminite para a atividade atlética (Hunt, 1993).

Entre os casos de laminite existe uma forma mais branda de laminite crônica, atribuída à influência endocrinopática, esta laminite é comumente identificada em cavalos e pôneis. Nesta manifestação, a apresentação da sensibilidade dolorosa dos cascos na separação crônica na interface laminar do animal é menor, se caracterizando por sinais brandos de dor e uma sutil remodelação da interface laminar do casco (Johnson et al., 2004).

As duas anormalidades endócrinas em equinos mais comumente associadas à laminite são o aumento nas concentrações sanguíneas de glicocorticoides associada aos quadros de disfunção da pars intermédia da hipófise (DPPI) ou a hiperinsulinemia, associada à síndrome metabólica equina (SME), comumente verificada em animais obesos (Johnson et al., 2004). A obesidade é considerada hoje, a causa mais comum de alteração do metabolismo da insulina e, conseqüentemente, de laminite em equinos (Treiber et al., 2006).

O termo síndrome metabólica equina é sugerido para cavalos obesos cujos resultados de exames clínicos e laboratoriais sugerem um risco aumentado para o desenvolvimento de laminite (Johnson, 2002). Esse termo foi adotado devido a sua semelhança com a síndrome metabólica em humanos, que é um conjunto de fatores de risco utilizados para prever a ocorrência de doença arterial coronariana e “diabetes mellitus” tipo 2 em humanos (Fulop et al., 2006).

2. OBJETIVOS

Estudar as alterações metabólicas e inflamatórias provocadas pela obesidade em equinos correlacionando-as com alterações teciduais e morfométricas dos cascos, de forma a conhecer melhor a fisiopatologia e proporcionar o diagnóstico precoce da laminite endocrinopática.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir obesidade em equinos normais por meio de uma dieta hipercalórica.
- Caracterizar a deposição de gordura regional (principalmente na crista do pescoço e base da cauda) em equinos com obesidade induzida.
- Caracterizar alterações no perfil hormonal e metabólico de equinos com obesidade induzida.
- Caracterizar possíveis alterações morfométricas na relação espacial entre falange distal e estojo córneo em equinos com obesidade induzida.
- Caracterizar alterações no tecido laminar de equinos com obesidade induzida.
- Correlacionar as alterações de adiposidade, de perfis hormonal e metabólico sistêmicos com alterações teciduais e morfométricas do casco.
- Determinar metodologias para a identificação do risco de ocorrência da SME e a laminite endocrinopática

4. HIPÓTESE

O desenvolvimento de obesidade em equinos promove alterações metabólicas e de biomarcadores sistêmicos que se correlacionam positivamente e proporcionalmente com alterações patológicas do tecido laminar.

CAPÍTULO 1

SÍNDROME METABÓLICA EQUINA: REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

As características que um cavalo deve possuir para se enquadrar com síndrome metabólica em equinos são: aumento da adiposidade em locais específicos como o acúmulo de gordura regional na base da cauda e na região do pescoço, hiperinsulinemia tornando esses animais com uma predisposição de desenvolver laminite clínica ou sub-clínica, na ausência de causas conhecidas, como sobrecarga de grãos, cólica, colite ou retenção placentária (Frank et al., 2010).

A desregulação insulínica (DI) é o ponto central dos mecanismos fisiopatológicos da síndrome metabólica equina, a grande maioria dos cavalos e pôneis afetados apresentam o quadro de obesidade generalizada ou regional. Entretanto, nem todos os cavalos com SME são obesos e nem todos os animais obesos desenvolvem a DI (Treiber et al., 2006). Ainda que alguns pesquisadores acreditem que o quadro de laminite não deve ser considerado um diagnóstico para a síndrome metabólica (Vick et al., 2007). Mesmo pela característica de que o quadro de laminite em equinos com a SME presente apenas claudicação leve, ou mesmo imperceptível pelo proprietário, com a sensibilidade do casco menor ou não aparente se compararmos com a laminite aguda que ocorre subsequentemente a quadros sépticos. Contudo, invariavelmente, o animal apresenta deformidades nas linhas externas de crescimento do casco e alterações radiográficas características da laminite (Longland, Byrd, 2006, Longland, 2007).

2. SÍNDROME METABÓLICA EQUINA (SME)

A SME não é uma doença propriamente dita, é um conjunto de anormalidades clínicas identificadas coletivamente em um único paciente, com uma probabilidade maior de desenvolver laminite, se comparado com outro animal que não possui essas alterações (Johnson, 2002). Esse termo foi adotado devido a sua semelhança com a Síndrome Metabólica em Humanos, que é um conjunto de fatores de risco utilizados para prever a ocorrência de doença arterial coronariana e “diabetes mellitus” tipo 2 (Fulop et al., 2006).

O uso do termo Síndrome Metabólica Equina é utilizado para diferenciar equinos com DPPI ou hipotireoidismo. O que diferencia um equino com SME de um com DPPI são os valores elevados de adrenocorticotropina (ACTH) plasmática ou pelos testes endócrinos dinâmicos. Os animais com SME podem estar predispostos à desenvolver DPPI, sendo necessário a monitoração desses animais quanto ao risco de apresentarem sinais clínicos de disfunção da hipófise (Reeves et al., 2001, Johnson, 2002, Schott, 2002, Matos et al., 2003, Donaldson et al., 2004).

As características fenotípicas de um equino com síndrome metabólica devem possuir segundo uma revisão da “American College of Veterinary Internal Medicine” (ACVIM) publicado em 2010 são:

- Obesidade generalizada e aumento da adiposidade em locais específicos (adiposidade regional) como um aumento da quantidade de gordura que envolve o ligamento da nuca ou em locais que não são tão comuns como perto da base da cauda, por trás da paleta ou na região da glândula mamária ou prepúcio,
- Quadro de resistência à insulina, caracterizada por hiperinsulinemia e glicemia anormal e respostas anormais da insulina e da glicose a desafios de glicose por via oral ou intravenosa,
- Possuindo entre 50 a 80% de chance de desenvolver laminite, na ausência de outros fatores reconhecidos como sobrecarga de grãos, retenção de placenta, colite, cólicas ou pleuropneumonia.

Com o avanço dos estudos sobre a fisiologia da SME tem sido incluído como componentes fenotípicos por vários autores características como a supra regulação de marcadores inflamatórios, propensão de desenvolver hipertensão arterial, infertilidade, hipertrigliceridemia e hiperleptinemia (Rugh et al., 1987, Vick et al., 2007, Vick et al., 2008, Bailey et al., 2008, Carter et al., 2009, Frank et al., 2010).

- Hipertrigliceridemia ou dislipidemia podem ser componentes da SME, com aumento das concentrações de lipoproteínas e triglicérides (Treiber et al., 2006, Frank et al., 2006),
- Hiperleptinemia ocorre como resultado do aumento da secreção do hormônio leptina pelos adipócitos, em resposta ao estado de resistência à insulina e resistência à leptina. A leptina é considerada como um fator de saciedade, com a função de sinalizar no hipotálamo de que existe um excesso de energia no organismo (Cartmill et al., 2003, Houseknecht, Spurlock, 2003),
- Hipertensão arterial foi observada em equinos que apresentaram laminite durante os períodos de verão (Bailey et al., 2008, Carter et al., 2009),
- Infertilidade em éguas pela observação da alteração de seu ciclo reprodutivo, pela diminuição do período ovulatório sazonal e pelo período prolongado do período inter ovulatório, sinais esses foram observados em éguas obesas com resistência à insulina (Gentry et al., 2004, Vick et al., 2006),
- Aumento dos mediadores inflamatórios, associados com animais obesos (Vick et al., 2007).

Salientando que a SME pode prenunciar o desenvolvimento de outras afecções além da laminite, como a síndrome hiperlipidêmica equina (lipidose hepática), osteocondrose, “diabetes mellitus” tipo 2, contudo, a laminite ainda representa a doença crônica com maior risco de se desenvolver em animais com essa síndrome (Johnson, 2002, Frank et al., 2010, Frank, 2011).

A síndrome hiperlipidêmica e hipertrigliceridemia equina ocorre de forma similar à esteato-hepatite não alcoólica humana e é mais comumente encontrada em raças de equinos metabolicamente eficientes, principalmente em certas raças de cavalos e pôneis, por exemplo o “American Miniature Horse”, Puro Sangue Árabe, “Stock”, “Miniature Sicilian Donkey” e o “Draft horse” (Waite et al., 2009). Já a osteocondrose afeta mais comumente equinos jovens em fase de crescimento, alimentados com dietas muito enérgicas e comitadamente associado à hiperinsulinemia (Johnson et al., 2012).

Como ocorre em humanos, os cavalos podem desenvolver “diabetes mellitus” tipo 2, como consequência à resistência à insulina e a SME. Mas não é comumente identificado, provavelmente

pelo fato dessa espécie ser herbívora e com um tempo de vida relativamente curto (Johnson et al., 2009, Waitt et al., 2009, Johnson et al., 2012).

Modernamente, tem-se utilizado a terminologia Desregulação Insulínica (DI) para definir os distúrbios do metabolismo da insulina características de animais com SME, como a hiperinsulinemia em jejum e uma resposta exagerada da insulina após o fornecimento de glicose por via oral ou intravenoso. A obesidade pode não ser considerada como sinal principal, mas sim uma característica de uma disfunção metabólica, que dependendo de fatores ambientais como alimentação e a atividade física podem servir como início de seu desenvolvimento. A indução da perda de peso é uma importante ferramenta de tratamento para animais com SME, mas em contrapartida, a disfunção metabólica pode persistir mesmo após o emagrecimento desse animal. O que se tem observado, é que as relações entre as características fenotípicas primárias e as medidas de diagnóstico para a SME são complexas, sendo influenciadas pelo ambiente e variações nas medidas entre os indivíduos como a raça, idade, sexo, fatores esses, que dificultam a criação de critérios para diagnósticos claros (Geor et al., 2013).

Em alguns trabalhos foi observado que os animais das raças “Welsh”, “Dartmoor”, “Morgans”, “Tennessee Walking Horses”, Árabe, Paso Fino, Crioula, Mangalarga Marchador, Campolina e animais pertencentes à raças de cavalos com origem britânica como os cavalos pertencentes à raça “Thoroughbred”, são mais suscetíveis à desenvolver SME quando comparados aos cavalos com origem nórdica (“Icelandic horses”), cavalos com sangue quente e frio (Manso Filho, et al., 2009, Karikoski et al., 2011, Geor, et al., 2013, Magalhães, et al., 2014, Drumond, et al., 2016).

Bem como a raça a idade é outro fator que pode ser determinante para o desenvolvimento de SME, existe a possibilidade de até 15% dos equinos acima de 15 anos de vida de desenvolverem SME, essa incidência pode aumentar em até 20% para cada ano vivido acima dos 15 anos. (Schott et al., 2001, Donaldson et al., 2002, McGowan e Neiger, 2003).

3. OBESIDADE

A obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde como um acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo no corpo do animal (Geor, 2008). Segundo o sistema de mensuração do escore de condição corporal (ECC) desenvolvido por Henneke et al. (1983), cavalos e pôneis com ECC 7 podem ser considerados com sobre peso e com ECC 8 ou 9 já são considerados obesos (Wild e Byrne, 2006).

Com o efeito de se caracterizar um problema para a criação dos equinos, tanto que muitos proprietários consideram até certo grau de obesidade como normal, aceitável ou até desejável. Em algumas competições, o animal é avaliado por meio de suas características físicas. Nessas condições, se o animal apresentar um grau de obesidade pode ser considerado uma vantagem (Johnson et al., 2009).

Em países desenvolvidos, a prevalência de obesidade pode estar estimada em torno de 19 a 40 % em uma população de equinos (Wyse et al., 2008, Thatcher et al., 2012). Para demonstrar como a obesidade é uma situação comum nesta espécie, um estudo avaliando 300 animais adultos, constatou a taxa de 19% de animais obesos (ECC entre 8 a 9) e 32% apresentaram sobrepeso (ECC entre 6,5 a 7,5) (Allan et al., 2000). Foi salientado em outro estudo onde uma população de

319 animais selecionados ao acaso, foi constatado que 45% desses animais foram considerados obesos ou muito obesos (Robertson, 2003).

A indução da obesidade ocorre com fornecimento de dietas ricas em grãos e forrageiras (capim e feno) com altos teores de carboidratos não estruturais, se tornando assim uma consequência do fornecimento em excesso de alimentação, propiciando o excesso das exigências metabólicas para o seu nível de atividade física. (Schott et al., 2001, Johnson, 2002).

Em virtude da obesidade, os animais apresentam quadros de intolerância ao exercício, ineficiência termorregulatória, desempenho reprodutivo anormal e aumento da probabilidade de desenvolvimento de lipomas mesentéricos (Henneke et al, 1983, Cymbaluk e Christison, 1990, Garlinghouse e Burrill, 1999, Garcia-Seco et al., 2005).

Quando os adipócitos atingem sua capacidade máxima de armazenamento, têm início alterações como ineficiência energética, processos inflamatórios e estresse celular. Até mesmo quadros de hipóxia podem ocorrer nos tecidos adiposo. Isso ocorre por meio do acúmulo de gordura em excesso no interior dos adipócitos, que por consequência se expandem, comprometendo assim o transporte de oxigênio por meio da compressão de capilares adjacentes. Junto com essa situação, o endotélio desses capilares pode não responder ao estímulo do óxido nítrico, diminuindo sua vasodilatação. Esses quadros de hipóxia dos adipócitos vão comprometer a ação mitocondrial e por consequência acabam estimulando o processo inflamatório, liberando citocinas e proteínas quimiotáticas de macrófagos (Goossens, 2008).

Importante ressaltar que o tecido adiposo não pode ser mais considerado como um órgão que apenas armazena energia, mas como um órgão endócrino com ação parácrina e autócrina. Esse tecido é responsável por produzir hormônios como as adipocinas ou adipocitocinas, que são liberadas dos adipócitos e de outras células residentes no tecido adiposo. Os adipócitos podem excretar leptina, resistina, adiponectina, visfatina e apelina. Além disso, libera citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6), proteínas quimiotáticas dos macrófagos (MCP-1), fator de inibição do macrófago (MIF), além de proteínas inflamatórias como haptoglobina, inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) e a proteína soro amiloide A (SAA) (Gerhardt et al., 2001; Sartipy e Loskutoff, 2003, Rajala e Scherer, 2003; Trayhurn e Wood, 2004, Rasouli e Kern, 2008).

3.1. AVALIAÇÃO DO GRAU DE OBESIDADE

O método mais comum para avaliação da obesidade em equinos é por meio da avaliação do escore de condição corporal (ECC) desenvolvido por Henneke e colaboradores (1983). Esse método utiliza a análise da deposição da gordura na região subcutânea, pela observação visual ou palpação do pescoço, espáduas, dorso e garupa, e sua pontuação segue uma escala de 9 pontos, demonstrado na Tabela 1 e Figura 1.

O ECC não é muito preciso quando queremos mensurar acúmulo de gordura regional. Essas deposições de gordura ocorrem muitas vezes de maneira assimétrica, dificultando a determinação real da situação corporal do animal (Geor, 2008). Esse dado é evidenciado pelo trabalho de Mottet et al. (2009), onde foi avaliado se o uso de ECC reflete alterações do acúmulo de gordura regional, sendo considerado uma técnica pobre, com um coeficiente de correlação de apenas 23,7%.

Para contornar essa deficiência existem outras formas para avaliar o acúmulo de adiposidade localizada, dentre elas, pode-se citar a mensuração da deposição de gordura na crista do pescoço (Figura 2), mensuração do escore da circunferência do pescoço (ECP) (Figura 3) e a aferição da espessura do tecido adiposo localizado na base da cauda, através do exame ultrassonográfico, esses padrões de determinação de acúmulo de gordura já foram confirmados como boas referências através de comparações com carcaças necropsiadas (Kane et al., 1989, Westervelt et al., 1976).

Tabela 1: Demonstração das características físicas utilizando a escala de escore de condição corporal (ECC) segundo Henneke et al., 1983.

1- Magreza Extrema
Processo espinhoso, costela, inserção da cauda, ílio e ísquio proeminentes. Estrutura óssea da cernelha, espádua e pescoço facilmente visíveis. Não se observa presença de gordura em nenhuma parte do corpo do animal.
2- Muito magro
Gordura cobrindo a base dos processos espinhosos. Extremidade dos processos transversos das vértebras lombares arredondadas. Costelas, inserção da cauda, ílio e ísquio proeminentes. Estruturas ósseas da cernelha, espádua e pescoço menos visíveis
3- Magro
Gordura cobrindo a metade dos processos espinhosos. Processos transversos das vértebras lombares não são palpáveis. Pouca gordura cobrindo as costelas. Processo espinhoso e costelas totalmente visíveis. Inserção de cauda proeminente, porém, as vértebras não são visíveis. Íleo e ísquio arredondados, porém ainda visíveis. Estruturas ósseas da cernelha, espádua com alguma cobertura de gordura.
4- Moderadamente magro
Sulco ao longo da região lombar. Espaço entre as costelas visíveis. Gordura pode ser palpada na inserção da cauda e sua proeminência depende da conformação do animal. Ílio e ísquio não são visíveis. Estrutura óssea da cernelha, espádua com alguma cobertura de gordura.
5- Moderado (ideal)
Costelas não são visíveis, porém, facilmente palpadas. Gordura na inserção da cauda se torna esponjosa. Cernelha arredondada, cobrindo o processo espinhoso. Espádua e pescoço ligados suavemente ao corpo do animal.
6- Moderadamente gordo
Pode haver sulco suave ao longo da região dorsolombar. Gordura cobrindo as costelas. Gordura mais macia na inserção da cauda. Gordura começa a ser depositada atrás e sobre a espádua e pescoço.
7- Gordo
Pode haver um sulco suave ao longo da região dorsolombar. Costelas podem ser palpadas individualmente, com depósito de gordura entre elas. Gordura mais macia na inserção da cauda. Gordura depositada atrás e sobre a espádua e pescoço.

8- Obeso
Depressão ao longo da região dorsolumbar. Costelas são difíceis de serem palpadas. Gordura da inserção da cauda torna-se muito macia. Área ao redor da cernelha e atrás da espádua com muita gordura. Pescoço espesso. Gordura depositada na parte interna das patas traseiras do animal.
9- Muito obeso
Depressão evidente ao longo da região dorsolumbar. Acúmulo de gordura sobre as costelas, formando placas. Acúmulo de gordura sobre a inserção da cauda, atrás da espádua e pescoço, formando dobras na pele. Gordura depositada na parte interna dos membros traseiros do animal, formando dobras.

Figura 1: Imagens demonstrando o ECC seguindo a escala de Henneke et al., 1983, modificado de Faleiros, 2002.



3.2.ACÚMULO DE ADIPOSIDADE LOCALIZADA

Em vários estudos realizados observou-se que o acúmulo de gordura regional está intimamente correlacionado com quadros de DI, hiperinsulinemia, dislipidemia, elevação da concentração de leptina, elevação dos ácidos graxos não esterificados, expressão do gene pró-inflamatório de citocina, aumento da concentração de proteína em sangue periférico e aumento do risco de

desenvolver laminite (Johnson, 2002, Sutherland et al., 2004, Vick et al., 2007, Vick et al., 2008, Carter et al. 2009).

Tendo em vista de que existe uma correlação positiva entre adiposidade regional e o aumento do risco de desenvolver doenças metabólicas, mesmo que independente do seu escore corporal, corroborando essa idéia Geor (2008) observou o desenvolvimento de laminite em equinos com $ECC < 7$ que ingeriram gramíneas, mas com acúmulo de gordura regional localizados no pescoço, tórax e na base da cauda. Carter et al., (2009) também constataram que o sistema de Henneke et al. (1983) não conseguiu demonstrar uma relação íntima com as variáveis sanguíneas da insulina como observado com a mensuração da deposição de gordura da crista do pescoço.

O aumento da deposição de gordura na crista do pescoço e o aumento da circunferência do pescoço estão intimamente correlacionado com quadros de resistência à insulina, Packer et al. (2010) observaram correlação com o acúmulo de gordura retro abdominal em equinos com a expressão de genes de leptina. Xavier et al. (2014) constataram correlação positiva com a análise de gordura por via ultrassonográfica na região da base da cauda e o ECC com alterações radiográficas indicadoras de laminite.

Dessa forma, é demonstrado que os adipócitos localizados em diferentes partes do organismo possuem características diferentes entre si, sendo que alguns adipócitos secretam sinais endócrinos que podem causar DI e hipertensão. Em muitas espécies verifica-se que os adipócitos presentes no omento e na região retroperitoneal possuem atividades endócrinas ativas, esses sinais endócrinos observados são as adipocinas, podendo ser incluídas neste grupo a angiotensina, resistina, leptina, ácidos graxos não esterificados, adiponectina e certas citocinas pró inflamatórias (Chaldakov et al., 2003, Lyon et al., 2003).

Consequentemente os tipos de adipócitos produzidas por qualquer depósito adiposo é variável, não obstante, certos depósitos de tecido adiposo (por exemplo, o omento e a gordura mesentérica em pacientes humanos obesos) são caracterizados pela aquisição de uma população de macrófagos ativos, que secreta citocinas pró-inflamatórias no sistema circulatório. Em animais obesos, estas citocinas derivadas de leucócitos são liberadas em grandes quantidades exercendo ação sistêmica, causando uma sinalização pró-inflamatória exacerbada. (Matsuzawa, 2008; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003).

Outra característica dos adipócitos omentais é a presença de conversores esteroidais, entre eles, a enzima 11β -hidroxiesteróide desidrogenase – 1 (11β – HSD), responsável por converter a cortisona inativa para o cortisol ativo. Esse cortisol derivado do tecido adiposo está intimamente ligado na patogênese da resistência insulínica e SM (Masuzaki et al., 2001).

Visto que a expressão local de moléculas inflamatórias no tecido adiposo é considerada como um dos papéis fundamentais para o desenvolvimento local e sistêmico de resistência à insulina em equinos obesos. Foi observado que a gordura acumulada no pescoço de equinos apresenta uma maior expressão dos genes de $IL-1\beta$ e $IL-6$, já na gordura visceral foi observado uma maior quantidade de macrófagos e leptina (de Luca et al., 2008, Vick et al., 2008, Weber et al., 2013, Maury, Brichard, 2010, Burns et al., 2010).

Dessa forma existem duas teorias que inter-relacionam a obesidade com a RI. A primeira pela diminuição da sinalização da insulina causada pela ação das adipocinas e citocinas produzidas pelo tecido adiposo. A segunda pelo acúmulo intracelular de lipídios nos tecidos sensíveis à

insulina. Essa situação pode ocorrer após o fornecimento de uma dieta rica em glicose, sendo convertida em gordura através da lipogênese. O aumento da concentração de gordura circulante será armazenado na região intracelular de tecidos não-adiposos como o músculo esquelético, fígado e pâncreas. Isso ocorre quando a capacidade de armazenamento do tecido adiposo é excedida, levando ao acúmulo de lipídios dentro dessas células e causando alterações nas funções normais, como o comprometimento da sinalização de insulina (Summers, 2006).

4. INSULINA

Entende-se como resistência à insulina (RI) a insensibilidade da superfície celular e de desordens intracelulares de tecidos insulino dependentes, principalmente nos tecidos musculares, adiposo e hepático. Kahn (1978) propôs que a RI pode ocorrer em três níveis, antes do receptor celular, no receptor celular e após o receptor celular de insulina (Kronfeld et al., 2005a).

A DPPI e a SME são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de RI (Walsh et al., 2009). As consequências causadas pela RI são a absorção deficiente de glicose pelos tecidos, elevação da síntese hepática da glicose pela via da gliconeogênese, aumento da lipólise tendo como resultado o aumento das concentrações de ácidos graxos livres plasmáticos e triglicérides (Waller et al., 2011, Frank e Tadros, 2014).

Cavalos com altas concentrações de insulina plasmática ($> 188\mu\text{UI/mL}$) possuem maior chance de desenvolver laminite, possuindo tempo de vida estimado de até 2 anos após seu diagnóstico. A associação entre equinos com quadros de resistência à insulina com o desenvolvimento de laminite foi observado pela primeira vez nos anos 80, sendo confirmado em outros estudos no decorrer dos anos (McGowan et al., 2004, Laat et al., 2010).

4.1.SÍNTESE E SECREÇÃO DA INSULINA

A insulina é um hormônio liberado pelas células β presentes nas ilhotas de Langerhans pancreáticas, que é excretada em resposta à hiperglicemia. A insulina é produzida como uma molécula de pró-hormônio (pró-insulina). Essa molécula sofre uma ação proteolítica, sendo convertida em um hormônio ativo. A sua liberação ocorre quando a glicose entra nas células β pancreáticas através do receptor do transportador de glicose 2 (GLUT2). Após sua excreção, a insulina atua através de receptores de insulina que estão presentes nos tecidos insulino dependentes. Ela tem como função estimular a captação de glicose para o interior dos tecidos. Os tecidos insulinos dependentes são o músculo esquelético, tecido adiposo e o fígado (Saltiel e Pessin, 2003).

Esse hormônio é sintetizado através da clivagem da pró-insulina em grânulos secretores, originando duas moléculas distintas, a insulina e o peptídeo C. Esse peptídeo de ligação é metabolicamente inerte, mas é liberado em quantidades equivalentes à insulina, podendo ser utilizado como um marcador da produção da insulina (Engelking, 2010).

A insulina tem alto peso molecular, e é uma proteína composta por duas cadeias, a cadeia α com 21 aminoácidos (aa) e a cadeia β com 30 aa, que são ligadas por duas pontes de dissulfeto. A variabilidade da insulina entre as espécies é pequena, desta maneira, suas atividades biológicas não diferem. Esse hormônio é responsável por desempenhar papel fundamental para manutenção da homeostase da glicose, do crescimento e diferenciação celular (Carvalho et al., 2002).

Os valores da insulina basal em equinos que passaram por um período de jejum prévio variam entre 5 a 30 $\mu\text{UI/mL}$. Esses valores são relativamente constantes, independente da dieta e do estado fisiológico. Se observado valores de insulina fora desse intervalo, pode ser um indicativo de anormalidade de seu metabolismo. Quanto à resposta da insulina após um desafio de glicose ou após o fornecimento de um alimento, sua secreção pode ser influenciada pelo tempo da última refeição, pelo tipo de alimento, pelo estado fisiológico do animal e pela concentração de cortisol presente na circulação do animal (Hintz, 1978, Ralston, 2002, Sticker et al., 1999, Walsh et al., 2009).

Embora a glicose pareça ser o fator primário de estímulo da insulina, também existem outros compostos que atuam em sua secreção como vários aminoácidos essenciais (arginina, lisina e leucina), ácidos graxos voláteis de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e corpos cetônicos. A influência desses componentes estimulantes depende do tipo de nutrição e estado nutricional do animal (Engelking, 2010).

4.2. AÇÕES E EFEITOS DA INSULINA

Após a sua liberação pelas células β , a sinalização intracelular da insulina começa através da ligação a um receptor específico, presente nas membranas celulares, conhecido como receptor de insulina (InsR). Esse receptor está presente em quase todos os tecidos dos mamíferos, com sua concentração variando entre eles. Por exemplo, os eritrócitos possuem até 40.000 unidades, enquanto que os hepatócitos e os adipócitos possuem cerca de 200.000 desses receptores. A insulina, ao se ligar a esse receptor, induz uma autofosforilação, gerando uma cascata de reações de fosforilação e defosforilação, exercendo efeitos metabólicos e de crescimento (Haber et al., 2001).

Como efeito à ligação da insulina com seu receptor, a cascata de fosforilação se inicia, promovendo a produção de múltiplos resíduos de tirosina, através da ativação da fosfoinositide-3 quinase do receptor. Dessa forma, o sinal é transmitido do receptor ao efetor final, promovendo a translocação de vesículas contendo os transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4), da região intracelular para a membrana plasmática. Noventa por cento dos GLUT4 estão presentes no interior das células e são translocados para as membranas celulares pela ação da insulina ou atividades físicas (Zecchins et al., 2004, Holman e Kasuda, 1997).

O processo de transporte da glicose, que é uma molécula insolúvel na membrana plasmática, da via extracelular para a intracelular ocorre através da difusão facilitada, dependente de proteínas transportadoras (GLUT), e é o gradiente do substrato que irá determinar a direção desse transporte. Essas proteínas estão presentes na superfície de todas as células. Contudo, nas células do intestino delgado e do túbulo renal, o processo de absorção e reabsorção da glicose ocorre de maneira diferente, por meio de um processo de transporte acoplado ao íon de sódio, sendo realizado pelas proteínas transportadoras SGLTs, que estão presentes na borda em escova da célula epitelial (Machado et al., 2006).

Outros estímulos podem ser responsáveis pela translocação dos GLUT4 para a membrana celular além da insulina, como:

- O exercício físico, que pode estimular o transporte de glicose por recursos independentes da fosfoinositide 3 quinase, possivelmente pela ativação da quinase 5AMP.

- O hormônio tireoidiano, que quando estimulado pela ação da insulina pode aumentar a captação da glicose basal, por meio do aumento da expressão do GLUT4.
- A levotiroxina, que melhora a sensibilidade à insulina nos cavalos e diminui as concentrações de lipídios plasmáticos.
- A leptina, que melhora a absorção de glicose de forma indireta, possivelmente pelo aumento da oxidação dos ácidos graxos (Abel et al., 1996, Muoio et al., 1997, Shepherd, Kahn, 1999).

A insulina controla a concentração de glicose no sangue, protegendo o organismo contra os efeitos adversos da hiperglicemia pós-prandial, mas também pode ter outras ações, que variam de acordo com o tecido estimulado. A insulina e a leptina possuem acesso ao cérebro a partir do plasma, controlando o apetite e o balanço energético. Quando a insulina é fornecida em excesso ao sistema nervoso central sua ação é comprometida não exercendo função no controle do apetite (Saltiel e Pessin, 2003, Sowers e Frohlich, 2004).

No fígado, a insulina promove o armazenamento de energia nos hepatócitos, por meio da estimulação da síntese do glicogênio, inibindo a gliconeogênese e a glicogenólise. Essa ação ocorre devido à redução da exportação de glicose do fígado, promovendo assim a formação dos precursores dos ácidos graxos e estimulando a glicólise. Este hormônio estimula a lipogênese do fígado, estimulando a secreção do VLDL e fornecendo triglicérides para o tecido adiposo. A insulina inibe a produção do glucagon, mas em contrapartida o glucagon estimula a sua produção (Engelking, 2010).

No tecido muscular a insulina estimula a entrada de K^+ dentro das células, promovendo o armazenamento de glicose dentro do tecido, estimulando a glicólise e promovendo a síntese de tecido proteico.

No tecido adiposo, a insulina estimula a produção dos adipócitos, ao incentivar a atividade da lipoproteína lipase (LPL). Tal processo ocorre pela ação nos ácidos graxos livres e no VLDL circulantes. Ao interagir com os adipócitos, a insulina inibe a lipólise através da diminuição da lipase, aumentando assim a produção de gordura no organismo do animal (Engelking, 2010).

Considera-se que a insulina pode agir como fator pró-inflamatório. Em estudos de indução de laminite por hiperinsulinemia, foi constatado um aumento da infiltração de leucócitos no tecido lamelar, elevação da concentração de matriz metaloproteinase 9 (MMP-9) plasmática e elevação de até 20% nos valores de $TNF\alpha$ e IL6 plasmáticos (Suagee et al., 2011). As alterações da atividade dos MMPs podem promover câncer, osteoartrites e laminite. Acredita-se que essa elevação pode ser resultado da ativação do receptor de insulina e por vias de sinalização mitogênica (ativação mitogênica através da proteína quinase – quinase) nos monócitos (Fischoeder et al., 2007, Laat et al., 2011).

4.3.RESISTÊNCIA À INSULINA (RI)

A resistência à insulina parece ser uma situação frequente em equinos. Foi observada hiperinsulinemia, com uma correlação positiva com o escore corporal e a medição da crista do pescoço, em 10 % de uma população de equinos selecionados aleatoriamente em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos da América (Geor et al., 2007). Outro estudo, realizado na Austrália,

mostrou que 28% de equinos de várias raças de pôneis apresentavam hiperinsulinemia (McGowan, 2008).

A resistência à insulina pode ser uma resposta fisiológica em situações como a gravidez e em momentos de estresse. Em éguas gestantes, é observado aumento no valor de insulina plasmática basal em conjunto com a elevação da concentração de glicose plasmática pós-prandial, elevação da produção da glicose hepática endógena basal e maior gliconeogênese. Essas alterações são atribuídas às concentrações crescentes de prolactina, cortisol e glucagon. A insulina também sofre elevação em resposta a ações de contra-regulação dos pós-receptores de insulina para a progesterona, estradiol, hormônio do crescimento, lactogênio placentário, e citocinas placentárias. As éguas gestantes apresentam essa característica para o fornecimento contínuo de nutrientes para o feto em desenvolvimento (Fowden et al., 1984, Johnson, 2008, Geor, 2010, George et al., 2011).

Mas a resistência à insulina também pode possuir causas patológicas como a obesidade, inflamação sistêmica, hiperadrenocorticismos e acromegalia. Isso ocorre devido a uma falha da sinalização dos receptores de insulina nas paredes celulares, prejudicando a ligação da insulina em seus receptores, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. Esses casos têm como consequência a diminuição da absorção da glicose e dos ácidos graxos não esterificados (AGNE), podendo também haver ação da insulina sobre o óxido nítrico, promovendo vasodilatação (Corry e Tuck, 2001).

Essa ineficácia da ação da insulina possui causas diversificadas. Pode haver comprometimento das vias de transmissão do sinal de insulina devido à diminuição da ocorrência de seus receptores. Mas também pode haver ineficiência da fosforilação da fosfoinositide-3-quinase, falha na atividade dos receptores de insulina (InsR-1, InsR -2), falha da migração dos GLUT-4 e também comprometimento da atividade das enzimas intracelulares (Rhodes, 2005).

Alguns fatores que interferem na eficiência da insulina nas células alvos são os glicocorticóides (GCs), os ácidos graxos livres e as adipocinas. Quando a capacidade da insulina em facilitar a remoção da glicose circulante é prejudicada, a concentração da glicose no plasma tende a se elevar, causando a estimulação contínua das ilhotas pancreáticas, levando a uma hiperinsulinemia (Fonseca et al., 2004).

Uma vez que os GCs são hormônios com ação antagonista à insulina, em vista disso, eles exercem efeito sobre o metabolismo intermediário, principalmente sobre os tecidos hepático, muscular e adiposo. Isso ocorre pela inibição da via de sinalização da insulina por diversos mecanismos, como a inibição da translocação de GLUT4 para a membrana celular e pela inibição da atividade da lipoproteína lipase (LPL), tendo como consequência a diminuição da captação de triglicérides na circulação (Weinstein et al., 1995; Ong et al., 1995).

Como se não bastasse as ações de outros fatores na ação da insulina, seu receptor possui um “feedback” negativo em relação ao seu volume circulante. Quanto maior a quantidade de insulina plasmática, menor será a disponibilidade de receptores nas membranas celulares. Essa ação ocorre pela diminuição de sua afinidade, pela redução de receptores expostos nas paredes celulares e pela diminuição da eficácia do receptor como transmissor de sinais estimulatórios (Shanik et al., 2008). Dessa forma, a hiperinsulinemia, por si só, promove resistência insulínica.

Visto que o mecanismo para que um animal fique insensível à insulina possivelmente seja pela não exposição de seus receptores de insulina para a superfície celular. Essa falha pode ser

resultante de sua não exteriorização ou através de sua degradação. Pode ocorrer através da diminuição da ação do receptor quinase, em decorrência do conjunto de vários fatores, como a fosforilação dos resíduos do receptor de serina, a desfosforilação da tirosina pelas fosfatases e através da ligação das moléculas inibitórias nos receptores (Krebs et al., 2003).

Além disso a diminuição da sensibilidade à insulina também pode ser uma resposta a alguns compostos presentes na circulação sanguínea. Entre eles, o TNF- α , que possui potentes efeitos inibitórios da sinalização da insulina no tecido muscular e adiposo. Também os ácidos graxos livres presentes em altas concentrações no plasma, observado em equinos obesos, podem diminuir a absorção de glicose nos tecidos periféricos pela diminuição da capacidade de estimular a atividade da fosfoinositídeo-3-quinase. Acrescentando a esses fatores, o cortisol em excesso pode reduzir a translocação de GLUT4 (Hotamisligil e Spiegelman, 1994, Dimitriadis, 1997, Boden, 1997).

Paralelamente à essas observações, estudos recentes têm correlacionado o aumento da ativação do receptor toll-like (TLR) com a resistência à insulina. A ativação dos TLRs está intimamente correlacionada com o comprometimento da regulação dos GLUT. Os TLRs são sinalizadores do sistema imunológico inato e são responsáveis pela regulação da sinalização e ativação de citocinas inflamatórias como a IL6 e TNF α (Konner e Bruning, 2011). Os TLRs podem ser ativados pela ação dos ácidos graxos livres e dos lipopolissacarídeos, ambos apresentam aumento em suas concentrações em quadros de resistência à insulina (Dasu et al., 2010, Laats et al., 2014).

Como resultado ao processo de RI, os níveis normais de insulina são insuficientes para uma resposta normal à insulina nos adipócitos, nos miócitos e hepatócitos. Esse quadro acontece somente em células insulino dependentes, acarretando em falha no reconhecimento do hormônio por parte dos receptores da insulina (Kahn, 1978). Isso promove comprometimento da sinalização da insulina com a atividade do receptor da insulina tirosina quinase e redução das etapas de fosforilação pós-receptores, que incidem sobre os efeitos metabólicos e vasculares da insulina nos tecidos alvo da insulina (Kashyap e DeFronzo, 2007).

Rosdale (2004) conjectura que quadros prolongados de RI causam mudanças no sistema nervoso central (SNC). Em indivíduos obesos, a gordura localizada na região do omento pode ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por meio de diversos mecanismos neuroendócrinos. Quando um animal está sadio, a insulina secretada pelo pâncreas após uma resposta glicêmica age no hipotálamo ventromedial e suprime o apetite, inibindo o ganho de peso. Já em quadros de RI, essa ação pode estar comprometida. A leptina também exerce uma função de saciedade no SNC e a falha de seu sinal no hipotálamo (resistência de leptina) também pode ser considerada como um fator causador de ganho de peso. Em um ciclo vicioso, animais obesos ficam resistentes à insulina e a resistência à insulina induz ao ganho de peso.

Visto que a ação comprometida da insulina desencadeia uma intolerância à glicose, pode ser observado um aumento relativo na glicemia. Entretanto, em equinos que apresentam quadros de RI, os valores de hiperglicemia são brandos. Essa situação pode ser explicada em equinos pelo fato que a elevação da produção da insulina parece compensar sua ação reduzida. O aumento da exposição das células que não são insulino dependentes à glicose, pode levar a glicotoxicidade, mesmo com um leve aumento das concentrações de glicose plasmático (Cosentino e Luscher, 1998).

As lesões causadas pela ação da glicotoxicidade são mais observadas em tecidos endoteliais, induzindo alterações como hipertensão e aterosclerose. Essa elevação da glicose provoca glicolisação das proteínas celulares normais, formando produtos finais de glicação avançada (AGEs). Esses AGEs desencadeiam uma peroxidação lipídica intracelular, originando espécies reativas de oxigênio (ROS), como os radicais de superóxido (Hayden e Tyagi, 2003, Valgimigli et al., 2003, Rosedale, 2004).

O excesso de ROS se traduz em estresse oxidativo, tendo como resultado a diminuição da produção do óxido nítrico, a elevação da produção de endotelina e a elevação de uma atividade pró-coagulativa. Em decorrência a esses fatores, observa-se aumento da vasopasticidade, hipercoagulabilidade e interferência da perfusão capilar. Esses fatores podem ser considerados como risco para o desenvolvimento da laminite em equinos, sendo confirmado nos estudos de Zhang et al. (2012) e de Laat et al. (2014), que observaram que a elevação de glicose plasmática pode ser responsável pelo aumento da secreção de insulina endógena e alteração da atividade endotelial. Contudo, nesses estudos não foram observados efeitos diretos da glicolisação dos aminoácidos.

Além das outras alterações que podem levar ao desenvolvimento da laminite endocrinopática a resistência à insulina também pode estimular fatores pró-trombóticos como o inibidor do ativador do plasmiogênio-1, fator de Von Willebrand, fibrinogênio, fator VII e a concentração circulante do complexo de trombina-antitrombina, e os fatores que são diminuídos são antitrombina III, proteína S e a proteínas C (Juhan-Vague et al., 2002; Johnson et al., 1998).

4.4.DESREGULAÇÃO DA INSULINA

Atualmente, o termo desregulação da insulina tem sido mais utilizado para descrever as alterações no metabolismo que resultam em hiperinsulinemia persistente com valores de glicemia normais (Boston e Nicholas, 2013). Considera-se que equinos apresentam quadro de hiperinsulinemia quando as concentrações plasmáticas de insulina forem maiores do que 200 μ UI/mL (Ralston, 1995, Ralston, 2002).

Anteriormente acreditava-se que a hiperinsulinemia estaria ligada apenas à RI promovida pela diminuição da resposta normal dos tecidos a níveis normais de insulina circulante, aumentando o tempo que o hormônio fica na circulação (Boston e Frank, 2013). Contudo, pesquisas em equinos demonstraram que tanto o aumento da secreção como a diminuição da depuração da insulina são fatores determinantes para levar à hiperinsulinemia.

Sabe-se também que existem outras substâncias que podem ser liberadas pelo organismo interferindo nesse metabolismo. As incretinas são um bom exemplo. Entre esses hormônios destacam-se o peptídeo glucagon – like 1 e o peptídeo insulínico glicose-dependente, que são secretados pelas células L e K presentes na mucosa intestinal e são degradados pela enzima peptidase dipeptidil, após a ingestão de açúcares, aminoácidos e gorduras. As incretinas estimulam a secreção de insulina pelas células β pancreáticas e diminuem a velocidade do esvaziamento estomacal, interferindo na hiperglicemia pós-prandial. Assim, quadros de hiperinsulinemia em animais com SME podem ser decorrentes da estimulação da produção das incretinas ou pela falha da ação da enzima peptidase dipeptidil. Foi observado em ratos que as incretinas promovem a hiperplasia das células β pancreáticas (Drucker, 2003, Mudaliar e Henry, 2010).

Outra teoria sobre a elevação dos valores da insulina plasmática seria sobre a intervenção da liberação de insulina pelo fígado em animais com SME. Vomo um volume maior do que 70% da insulina produzida pelas células β do pâncreas e é liberado pelo acesso portal antes de ser distribuído para a circulação periférica, o fígado com lipidose interfere na liberação insulina no organismo (Toth et al., 2010).

4.5.DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da desregulação insulínica e sua insensibilidade pode ser realizado por meio de testes que consideram tanto a insulina e como a glicose, já que ambos constituintes têm seu comportamento modificado. Vários procedimentos foram elaborados para executar essas mensurações. É necessário a determinação exata dos intervalos normais para cada teste de diagnóstico com vários fatores que podem interferir nos resultados como a idade, raça, condicionamento físico e tipos de dieta (Valberg e Firshman, 2009).

Existem basicamente dois tipos de testes. Os estáticos, que se baseiam em valores basais de glicose e insulina. E os testes dinâmicos, que se baseiam na resposta do organismo à aplicação de glicose e/ou insulina. Os dinâmicos são mais complexos e envolvem coletas seriadas de sangue, contudo são considerados mais fidedignos. Os testes dinâmicos demonstram uma imagem completa dos valores de insulina e glicose. Embora um teste ideal ainda não foi determinado, os testes dinâmicos são mais sensíveis para determinar quadros de RI do que os valores basais (Frank et al., 2010).

4.5.1. MENSURAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INSULINA BASAL

Os valores de glicose basal raramente estão elevados em equinos com resistência à insulina, isso pode acontecer devido à produção compensada de insulina, tentando reverter a resistência à insulina nos tecidos (Morgan et al., 2015).

Já a mensuração da insulina basal é uma prática útil, auxiliando no diagnóstico e monitoração da SME. O valor basal de insulina pode ser utilizado para determinar se existe um fator de risco para desenvolver laminite e assim orientar quando é o melhor momento de intervir (Morgan et al., 2015).

Antes de coletar as amostras sanguíneas para a mensuração da insulina, o animal deve passar por um período mínimo de jejum alimentar prévio de no mínimo 6 horas e elas deverão ser realizadas pela manhã. Se forem existir coletas repetidas é de grande importância que todas as coletas devam ser realizadas de maneira padronizada (Carter et al., 2009, Frank et al, 2010, Morgan et al., 2015).

O acompanhamento dos valores de insulina basal pode ser relevante porque a hiperinsulinemia compensatória é uma característica comum em equinos com RI. Mas existem situações em que esse teste pode falhar, por exemplo, quando o quadro de RI está no início ou brando e a elevação de insulina compensatória ainda não se estabeleceu ou se o valor da insulina plasmática é ainda muito baixo. Essa característica pode ser evidenciada ainda pelo fato de que os intervalos dos valores de referência são muito amplos.

Dependendo do laboratório de pesquisa, existe uma grande variação dos valores de referência para se determinar se o animal está apresentando um quadro de hiperinsulinemia. O laboratório da Universidade de Tennessee considera que um animal está hiperinsulinêmico quando os valores da concentração da insulina plasmática forem acima de 30 $\mu\text{UI/mL}$. Já o centro de diagnóstico de Saúde Animal da Universidade Estadual de Michigan utiliza 43 $\mu\text{UI/mL}$ como valor de referência (Frank, 2006).

Apesar da medição de insulina ser uma ferramenta viável para os clínicos que trabalham a campo, esse procedimento não é considerado totalmente confiável, devido a existência de muitos fatores que interferem nos valores de insulina plasmática. Por exemplo, o tipo da dieta que é fornecida a esses animais. Se a dieta é rica em concentrados, pode haver elevação dos valores de insulina basais. Estresse fisiológico causado por exercícios agudo ou quadros de dor podem diminuir os valores de insulina, isso pode ser causado possivelmente por um aumento de catecolaminas na circulação, que agem inibindo a produção de insulina pelo pâncreas (Gordon et al., 2007, Borgia et al, 2011),

Outros fatores que podem interferir nas concentrações de insulina e glicose são a idade, sexo, estado nutricional, tornando necessário o desenvolvimento de métodos mais precisos para o diagnóstico de RI.

4.5.2. INDICADORES INDIRETOS (PROXIES) COM BASE NAS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE GLICOSE E INSULINA BASAIS

Os indicadores indiretos ou “proxies” são valores obtidos por fórmulas que utilizam os valores basais de insulina e glicose para determinar se os animais apresentam quadros de sensibilidade ou de resistência à insulina. Eles avaliam modelos de homeostase, fornecendo estimativas padronizadas, que foram correlacionados com testes que avaliam a sensibilidade à insulina. A grande vantagem do uso dos “proxies” é pelo fato de se utilizar os valores de glicose e insulina plasmáticas, sendo uma forma prática de demonstrar se o animal está apresentando um estado de RI (Treiber et al., 2006). Os cálculos são simples e utilizam os valores basais de glicose e insulina para a interpretação em “quintiles”, onde 1 é considerado baixo e 5 alto (Kronfeld, 2006).

Treiber (2005) adaptou alguns “proxies” para serem utilizados em equinos, utilizando valores basais de glicose (mg/dL) e insulina ($\mu\text{U/L}$) eles estão descritos abaixo:

$$\begin{aligned} \text{HOMA} &= (\text{glicose} - \text{insulina})/22,5 \\ \text{HOMA} - \text{IR} &= \text{glicose (mg/dL)} \times 0,0555 \times \text{insulina } (\mu\text{U/ml}) / 22,5 \\ \text{RISQI} &= 1/ \sqrt{\text{insulina}} = \text{insulina}^{-0,5} \\ \text{G:I} &= \text{glicose/insulina} \\ \text{MIRG} &= (800 - 0,3 [\text{insulina} - 50]^2) / (\text{glicose} - 30) \\ \text{QUICKI} &= [\log (\text{glicose} \times \text{insulina})]^{-1} \end{aligned}$$

No “proxie” HOMA-IR, o animal é considerado com diagnóstico positivo à RI quando apresenta um valor superior à 2,71 (Geloneze e Tambascia, 2006).

Os animais são considerados sadios quando os valores do “proxie” RISQI for maior do que 0,32, se os valores forem menores do que 0,32 pode ser um indicativo de RI e se o valor observado for menor do que 0,22 considera-se como quadro de RI severa.

Quando se utiliza o “proxie” MIRG e o valor observado é menor do que 5,6 o animal é considerado sadio, mas mesmo se os valores de MIRG e os valores da relação entre a glicose com a insulina (G:I) forem considerados normais deve-se observar os valores basais de glicose, se eles estiverem acima de 100 mg/dL é um indicativo de RI.

Se o valor da relação de G:I for menor do que 4,5 o animal está apresentando um quadro severo de RI, se estiver no intervalo entre 4,5 a 10 o animal é considerado com um quadro de RI compensatória e se o valor for maior do que 10 o animal é considerado saudável (Treiber et al. 2005, Treiber et al., 2006).

Brojer et al. (2015) observaram que os “proxies” QUICKI, RISQI e o HOMA - IR apresentaram boa correlação com o sistema considerado “ouro” para o diagnóstico da sensibilidade à insulina, o clamp hiperinsulinêmico – euglicêmico (EHC), mas não conseguiram ter uma boa correlação durante o período de ganho de peso dos animais.

Segundo Morgan et al., (2015), os “proxies” mais utilizados em equinos são o RISQI e o MIRG. Lembrando que esses “proxies” utilizam valores basais, estando sujeitos às limitações já observadas anteriormente, mas como eles convertem valores não lineares para valores lineares é mais recomendado utilizá-los para acompanhar animais por longos períodos.

4.5.3. TESTES DINÂMICOS

4.5.3.1. Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico

Considerado como padrão de referência para determinar a resistência insulínica, contudo muito trabalhoso para ser utilizado rotineiramente. Esse teste é realizado através de uma taxa de infusão de glicose, com a finalidade de manter o animal com os valores de glicemia normais durante um período de hiperinsulinemia induzido, realizando mensurações seriadas de glicose e insulina. Ele é iniciado após um período de jejum de 12 horas. Uma amostra de sangue é coletada 5 minutos antes do início do teste para análise de glicose e insulina basais. As mensurações da concentração de glicose são realizadas nos tempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150 e 180 minutos, e as mensurações de insulina são realizadas nos tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos (Frank e Tadros, 2014, Pratt et al., 2005).

A insulina é infundida através de bomba, por via IV na dose de 40 μ U/min/kg de peso vivo. A glicose será oferecida concomitantemente na dose de 0,5g/kg de peso vivo, IV com o intuito de manter o animal euglicêmico, com o valor de glicemia plasmática de 0,2 mmol/L, se ocorrer variação neste valor deve ser corrigido empiricamente. Os valores da glicose plasmáticas devem ser acompanhados através do uso de glicosímetro (Vick et al., 2007).

O período de infusão será de 180 minutos. Os primeiros 90 minutos são considerados um período de equilíbrio e os 60 minutos finais são utilizados para calcular a taxa de absorção de glicose pelo corpo do animal. Como a concentração da glicose não é constante, é necessário um cálculo de correção (“space correction” [SC]), o SC será determinado pela fórmula a seguir:
 $SC = (G2 - G1) \times (0,19 \times PA) / (T \times PA)$ (Frank e Tadros, 2014).

A unidade do SC será de mmol/kg/min, G é a concentração da glicose basal e do tempo do intervalo, o T é o intervalo que está sendo calculado, PA é o peso do animal. Para mensurar a quantidade de glicose que foi infundida (M) é utilizado a fórmula descrita abaixo:

$M = GIR - SC$. GIR é a taxa de infusão da glicose (mmol/kg/min) e o SC é o espaço de correção. O cálculo da concentração de Insulina (I) é através da média das concentrações de insulina mensuradas no soro dos 60 minutos finais do teste.

A determinação do índice de sensibilidade à insulina é através da relação de M/I. O animal é considerado resistente à insulina quando o volume de glicose infundido for menor quando comparado com animais considerados normais (Pratt et al., 2005).

4.5.3.2. Teste de Tolerância à Glicose Intravenosa (TTGIV)

O objetivo deste teste de diagnóstico é acompanhar como as concentrações de insulina e glicose se comportam após a administração em “bolos” de glicose por via intravenosa. Após um período prévio de jejum alimentar de 12 a 24 horas será iniciado o teste. Uma solução de glicose na concentração de 50% deverá ser administrada por via intravenosa no volume de 0,5g de glicose por kg de peso vivo, durante um período de 10 minutos (Mehring, Tyznik, 1970, De La Corte et al., 1999). Amostras de sangue venoso serão coletadas nos momentos 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração da glicose para determinação da concentração plasmática de glicose e da insulina. O resultado será calculado através do uso das medidas da meia vida da eliminação da glicose e da taxa de rotatividade fracionária para a determinação de um quadro de resistência à insulina (Kaneko, 1989).

Animais sadios apresentarão um aumento imediato na concentração de glicose plasmática e um posterior retorno aos níveis basais dentro do período de 60 min. após a administração da glicose. Um animal com um quadro de RI tem o potencial de produzir um pico mais alto de glicose no sangue e um atraso consistente no retorno ao valor basal superior a 2 horas (Garcia e Faia, 1986).

Quando se analisa a curva da insulina em animais sadios, ela deve ter um comportamento correspondente à curva de glicose, com um pico aproximadamente 30 minutos após a administração da glicose. Se o animal apresentar a função das células β do pâncreas prejudicada será observado uma curva de glicose tardia e a resposta à insulina pode ser tardia. O TTGIV não é um meio sensível de medir a resposta pancreática debilitada (Firshman e Valberg, 2007)

4.5.3.3. Teste Combinado de Glicose-Insulina (TCGI)

O TCGI é um teste que utiliza uma aplicação em “bolos” de glicose por via intravenosa, seguido pela infusão de insulina. O volume de glicose (50%) a ser administrado é de 150 mg/kg de peso vivo e o volume de insulina é de 0,10 UI/kg de peso vivo. A insulina deve ser fornecida imediatamente após a infusão de glicose. As amostras sanguíneas serão colhidas nos momentos 0, 1, 5, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120 e 135 minutos após a administração dos fármacos.

A glicose é mensurada com a utilização de um glicosímetro. Quando o valor da glicemia se apresentar acima do valor basal durante um período de 45 minutos é um indicativo de RI. Mas se nos primeiros 45 minutos do teste os valores de glicose continuarem próximos dos valores basais e os valores de insulina forem superiores à 100 μ UI/mL, esse também é um indicativo de RI concomitante a um indício de hiperplasia das células β do pâncreas. Isso se deve a uma produção

elevada de insulina compensatória para tentar manter a homeostase da glicemia. Já quando um animal apresentar altos valores de glicose com baixas concentrações de insulina, isso pode significar um quadro de RI descompensada (Frank e Tadros, 2014).

Existe a possibilidade de ocorrer um episódio de hipoglicemia. Assim é recomendado manter duas seringas de 60 ml contendo glicose (50%) para serem utilizadas caso o animal apresentar fasciculações musculares ou fraqueza profunda, ou se as concentrações de glicose plasmática forem menores do que 40 mg/dL (Eiler et al., 2005, Frank, 2006).

4.5.3.4. Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

O TTI mensura a resposta da glicose sanguínea frente a administração “bolos” de insulina. É uma medida direta da sensibilidade dos tecidos à dose de insulina. A metodologia desta técnica deve ser realizada após um período de 12 horas de jejum alimentar prévio.

A dose da insulina vai variar entre 0,2 a 0,6 UI/kg de peso vivo. As amostras serão coletadas nos momentos 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90 e 120 minutos e a área sob a curva deverá ser calculada. Ou podem ser analisadas as concentrações de glicose. Em um animal sadio, os valores de glicose devem diminuir em até 50% em relação ao valor basal, no período entre 20 a 30 minutos, e devem retornar aos valores normais após 90 a 120 minutos. Em um animal com RI os níveis de glicose plasmática não diminuem a níveis tão drásticos em comparação ao valor basal e irão retornar aos valores basais mais rapidamente (Kaneko, 1989, Ribeiro et al. 2004). O teste de resposta glicêmica à insulina é a forma simplificada deste teste (Bertin e Sojka-Kritchevsky, 2013).

4.5.3.5. Teste de Resposta Glicêmica à Insulina (TTI)

Uma simplificação do TTI. Esse teste é realizado após a aplicação de insulina por via intravenosa, para observar o índice de absorção de glicose. Para ser realizado deve ser respeitado um período de jejum prévio de 12 horas. Após esse jejum será coletada uma amostra de sangue basal considerada coleta tempo 0, para analisar a glicose através de um aparelho de glicosímetro. Imediatamente após a coleta basal de sangue, será administrado por via intravenosa insulina recombinante regular humana (Humulin, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN) na dose de 0,1 UI/kg de peso vivo. Após 30 minutos da administração de insulina, será coletada uma segunda amostra de sangue venoso para análise da glicose através do glicosímetro.

Para determinar se o equino é considerado resistente à insulina, a concentração da glicose plasmática da amostra coletada 30 minutos após a aplicação de insulina deve estar maior do que 50% do valor da glicose da amostra da coleta do tempo 0 (Caltabilota et al., 2010, Bertin e Sojka-Kritchevsky, 2013).

Se o animal apresentar um valor menor ou igual a 20 mg/dl de glicose deve ser administrado 150 mg/kg de peso vivo de glicose à 50%. Se os animais apresentarem sinais clínicos de hipoglicemia como sudorese, fasciculações musculares ou ataxia, deve ser oferecida alimentação rica em carboidrato, os animais devem ficar em observação o fim destes sintomas de hipoglicemia (Bertin e Sojka-Kritchevsky, 2013).

4.5.3.6. Teste de Tolerância à Glicose Oral (TTGO)

Na atualidade é considerado o teste mais prático e completo, pois avalia a absorção de glicose pelo intestino delgado, a absorção de glicose hepática, a função endócrina do pâncreas e a resistência à insulina. Para a realização do teste o animal precisa estar em jejum alimentar prévio de 12 horas. Neste teste a glicose deve ser fornecida por via oral na dose de 1g/kg, utilizando sonda nasogástrica, as amostras sanguíneas são coletadas nos intervalos de 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração de glicose para analisar os valores de glicose e insulina plasmáticas (Valberg e Firshman, 2009). Contudo pode ser simplificado com coleta com até 120 minutos.

É observado um aumento máximo nos valores de glicose plasmática entre os períodos de 90 a 120 minutos após a administração da glicose. Em animais saudáveis as concentrações da glicose devem retornar ao valor basal entre 4 a 6 horas depois da administração de glicose por via oral. Quando observamos um aumento da concentração de glicose e o valor de insulina sérica for maior do que 60 μ UI/mL é sugestivo de redução da função pancreática ou RI (Johnson et al., 2012). O teste pode sofrer interferência pelo período de jejum sofrido pelo animal, idade, dieta e estresse (Roberts, 1973, Ralston, 2002, Kronfeld et al., 2005b).

4.5.3.7. Teste de Baixa Dose de Glicose Oral (TBDGO)

Esse teste pode demonstrar a capacidade de secreção de insulina, quadros de sensibilidade do tecido à ação da insulina e a capacidade do intestino de absorver o desafio de glicose de um equino. O TBDGO é delineado por meio do fornecimento de glicose na dose de 0,25g/kg por via oral, através do uso de seringa misturada com água ou à um suco de maçã. Serão coletadas amostras de sangue venoso nos momentos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. após a administração da glicose.

Serão analisados a glicose e a insulina plasmática. Em animais sadios a glicose apresentará um pico de 90 a 120 mg/dL entre as coletas realizadas nos momentos 60 e 90 min. e a insulina deverá estar abaixo de 20 μ UI/mL após as amostras coletadas nos momentos 60 e 90 min. (Ralston, 2002).

Respostas com valores de insulina e glicose muito abaixo da normalidade podem significar uma diminuição do esvaziamento gástrico ou comprometimento da absorção da glicose e respostas com valores elevados ou prolongados de glicose e insulina podem ser observados em animais com disfunção na hipófise, obesos, idosos, genética com predisposição à RI ou animais com quadros de RI (Ralston, 2002, Ralston, 1995, Krusic et al., 1997).

5. BIOMARCADORES METABÓLICOS

Como visto anteriormente, as técnicas para diagnosticar a RI se caracterizam, muitas vezes, por serem complexas e de alto custo para o seu uso no cotidiano clínico. Assim, a identificação de métodos mais acessíveis para serem utilizados na prática clínica é imprescindível para tornar possível intervenções precoces e uma melhor avaliação e acompanhamento dos animais com SME (Vasques et al., 2009).

Os biomarcadores podem ser definidos como fatores que são mensurados de maneira objetiva, possuindo como função definir processos fisiológicos ou patológicos para uma intervenção terapêutica precoce, podendo ser utilizados para o diagnóstico de várias afecções. Dependendo de qual finalidade, eles podem ser classificados como de suscetibilidade, de exposição e de efeito, sendo uma ferramenta para a identificação de uma doença ou de uma condição adversa com certa antecedência (Amorim, 2003, Galantino-Homer et al., 2013).

Para a SME, os potenciais biomarcadores a serem utilizados são: as células de dano tecidual inespecífico, estresse celular, biomarcadores de resposta inflamatória, de resposta de lesão de tecido específico, hipertensão, lipoproteínas e a RI. Apesar de que marcadores inespecíficos possam estar alterados em decorrência de outras alterações, é possível definir um padrão específico da expressão desses biomarcadores e desenvolver ensaios múltiplos para a sua detecção simultânea (Treiber et al., 2006, Carter et al., 2009, Galantino-Homer et al., 2013).

5.1.PRESSÃO ARTERIAL (PA)

A PA é a força exercida pelo sangue contra a área da parede arterial, ela pode ser demonstrada como PA sistólica (PAS), PA diastólica (PAD) e PA média (PAM), com a unidade dos valores em milímetros de mercúrio (mmHg) (Cortadellas, 2012).

Os fatores que regulam a pressão arterial são o débito cardíaco e a resistência periférica dos vasos, e quando alguns desses fatores ou os dois estão comprometidos são observadas alterações em seus índices. Diferentes mecanismos de controle da pressão vascular são responsáveis por sua manutenção, através da regulação do calibre e a reatividade vascular, a distribuição do fluido dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco. Existe um equilíbrio entre esses mecanismos e quando ocorre uma desarmonia entre eles, principalmente nos fatores pressores, tem início a hipertensão primária. O aumento da resistência periférica é o principal fator para induzir hipertensão, sendo influenciada pela regulação da luz dos vasos ou pela espessura de sua musculatura (Folkow, 1982).

Diversos fatores funcionais podem atuar no aumento da resistência periférica, como a atividade simpática modulada pelas aferências de diferentes reflexos, por ações de substâncias vasopressoras ou vasodepressoras circulantes ou por meio de fatores produzidos pelas próprias células da musculatura lisa dos vasos. Existem evidências de que diferentes hormônios pressores estimulam o aumento da parede vascular, enquanto as substâncias vasodilatadoras têm efeito oposto, inibindo a sua proliferação celular. Entre os hormônios, a angiotensina II, a norepinefrina, a vasopressina e a insulina podem promover essas alterações. A hipertensão primária é o resultado do desequilíbrio entre os fatores vasoconstritores, promovendo o crescimento da musculatura vascular, com os fatores vasodilatadores, que inibem esse crescimento (Krieger et al., 1999).

Como a hipertensão é resultante do desequilíbrio da atuação dos diferentes reguladores, pode ser considerada como uma doença multifatorial ou uma síndrome quando está acompanhada de obesidade, alterações do metabolismo lipídico e glicosídico e resistência à insulina (Krieger et al., 1999).

Como já foi observado nesta revisão, equinos podem desenvolver a síndrome metabólica equina, cuja as características fenotípicas são obesidade generalizada, RI, hipertrigliceridemia, elevação dos mediadores inflamatórios, predisposição à desenvolver laminite e quadros de hipertensão

arterial (Vick et al., 2007, Vick et al, 2008, Bailey et al., 2008, Carter et al., 2009, Rugh et al., 1987, Frank et al., 2010).

Bailey et al. (2008) constataram em seu experimento uma elevação na pressão diastólica e sistólica em cavalos com as alterações fenotípicas da SME, com um valor médio de 89,6 mmHg, enquanto os animais controle apresentaram um valor médio de 76,8 mmHg, teorizando que a hipertensão é observada frequentemente em humanos com síndrome metabólica, concluindo que equinos também podem desenvolver esse quadro e que, possivelmente, possam possuir a mesma causa, que é uma disfunção endotelial vascular.

Existem quatro mecanismos envolvidos na hipertensão induzida por RI: A retenção de Na⁺, a hiperatividade do sistema nervoso simpático, a alteração do transporte de íons da membrana e a proliferação das células do músculo liso vascular, que promovem alterações no calibre dos vasos (DeFronzo e Ferrannini, 1991). Além disso, disfunção arterial em humanos pode induzir alterações arteriotrombóticas, como a proliferação do músculo liso vascular, a expressão de moléculas pró-inflamatórias e a trombose (Flammer e Lucher, 2010).

Animais com hiperinsulinemia e com RI geralmente possuem altos valores de lipídios sanguíneos, entre eles o VLDL e os triglicérides que possuem ação aterogênica. A aterogênese é uma condição de reação do endotélio que promove aterosclerose. Essa é uma doença inflamatória crônica multifatorial, que ocorre em resposta a lesões do endotélio. A geração da placa aterosclerótica tem início após a agressão ao endotélio vascular, pela ação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons) e pela hipertensão.

Essa lesão aumenta a permeabilidade para as lipoproteínas plasmáticas, causando sua retenção no espaço sub-endotelial. O LDL estando no espaço sub-endotelial começa a sofrer oxidação se tornando imunogênico, estimulando a agregação dos leucócitos na superfície endotelial. Essas moléculas de adesão atraem os monócitos e os linfócitos, os monócitos migram até ao espaço sub-endotelial. No espaço sub-endotelial o monócito se diferencia em macrófago, que acaba por fagocitar as LDL oxidadas. Esses macrófagos repletos de lipídios são denominados de células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (Sposito et al., 2007).

A própria insulina tem efeitos aterogênicos ao estimular a síntese de vários fatores de crescimento. Esse efeito ocorre pelo estímulo da proliferação celular do músculo liso da parede das artérias, pelo aumento da síntese do colágeno endotelial e pelo estímulo na formação e na diminuição da regressão das placas lipídicas (DeFronzo e Ferrannini, 1991).

Alguns mediadores inflamatórios estimulam a migração e a proliferação das células musculares lisas da camada média arterial, produzindo matriz celular que gerará a capa fibrosa da placa aterosclerótica. Essa capa aterosclerótica é formada por elementos celulares componentes da matriz extracelular, possuindo núcleo lipídico. A ruptura dessa capa libera material lipídico altamente trombogênico, podendo levar a alterações clínicas da aterosclerose (Sposito et al., 2007).

Existem evidências de que a disfunção endotelial pode predispor ao desenvolvimento de laminite em equinos com SME. Também já se observou que equinos obesos e com RI podem apresentar hipertensão (Bailey et al., 2008, Robertson et al., 2009, Katz e Bailey, 2012).

Além da sua ação aterogênica, a insulina pode promover vasodilatação ou vasoconstrição na parede endotelial. Em humanos saudáveis, a insulina se liga aos seus receptores no endotélio, causando a fosforilação do substrato do RIns-1, através da via fosfoinositídeo-3-quinase, ativando óxido nítrico sintase e promovendo vasodilatação (Venugopal et al., 2011).

Entretanto, também já se verificou em camundongos com RI, que a insulina pode ativar as proteíno-quinases ativadas pelos mitógenos gerados pela elevação da secreção do vasoconstritor endotelina -1. Essa inibição pode promover desequilíbrio, acarretando em quadros de vasoconstrição. A vasoconstrição foi observada em equinos, onde foi constatado a presença da proteíno-quinases ativadas por mitógenos nos vasos laminares do casco, sendo observado uma maior vasoconstrição das veias do que nas artérias laminares (Potenza et al., 2005, Peroni et al., 2006, Venugopal et al., 2011).

Outra via de ação indireta da RI no tecido endotelial seria pelo aumento relativo da concentração da glicose plasmática, expondo as células que não são insulino dependentes à glicose em excesso (Cosentino e Luscher, 1998). As lesões causadas por essa glicotoxicidade são mais testemunhadas em tecidos endoteliais, favorecendo a hipertensão e a aterosclerose.

Os AGES também podem estar envolvidos, causando estresse oxidativo. Os ROS causam a diminuição da produção do óxido nítrico, com uma elevação da produção de endotelina e aumento da atividade pró-coagulativa. Em decorrência a esses fatores, observa-se aumento da vasopasticidade, hipercoagulabilidade e interferência da perfusão capilar com consequente hipertensão arterial (Hayden e Tyagi, 2003, Valgimigli et al., 2003, Rossdale, 2004).

5.2.METABOLISMO LIPÍDICO

Os lipídios de maior importância para o uso clínico e fisiológico são os fosfolipídios, o colesterol, as triglicérides e os ácidos graxos. Os fosfolipídios são os constituintes básicos das membranas celulares. O colesterol é o predecessor da vitamina D, dos hormônios esteroidais e dos ácidos biliares, agindo também na ativação enzimática. Os triglicérides possuem três ácidos graxos em sua base ligados a uma molécula de glicerol e têm como função o armazenamento de energia no tecido adiposo e muscular. Os ácidos graxos podem ser classificados dependendo do número de ligações duplas entre seus átomos de carbono, podendo ser chamados de saturados quando não possuem, de monoinsaturados quando possuem apenas uma ligação e polinsaturados quando possuem mais de uma ligação (Sposito et al., 2007).

5.2.1. LIPOPROTEÍNAS

As lipoproteínas são responsáveis pela solubilização e pelo transporte dos lipídios, podem possuir diferenças em tamanho, densidade e composição química, podendo ainda possuir diferenças em suas ações “in vivo” na oxidação, glicação e dessialização, agindo no metabolismo lipídico e no processo aterogênico. Segundo Correa e Correa (1985), as lipoproteínas são esféricas, tendo como sua composição lipídios neutros (triglicérides e ésteres de colesterol), fosfolipídios e colesterol associados com apoproteínas (apos). O colesterol e os triglicérides são encontrados no núcleo das lipoproteínas, cobertos por uma camada de fosfolipídios, colesterol não esterificado e uma ou mais apoproteínas específica. (Champe e Harvey, 1996).

Os tipos de apolipoproteínas conhecidos são A-I, A-II, A-IV, B-48, B-100, C-I, C-II, C-III, D e E. Cada uma possui uma função específica nas lipoproteínas, por exemplo, as apolipoproteínas responsáveis pela formação intracelular das partículas de lipoproteínas são as B-100 e B-48. Os apolipoproteínas responsáveis pela ligação aos receptores das membranas são as B-100 e E, e as apolipoproteínas que possuem co-fatores enzimáticos são as C-II, C-III e A-I (Lehninger et al., 1980, Sposito et al., 2007).

As lipoproteínas podem ser classificadas em quatro classes, separadas em dois grupos. O grupo das que são ricas em triglicérides, maiores e menos densas, é constituído de quilomícrons de origem intestinal e as lipoproteínas de muito baixa densidade também denominadas de “very low density lipoprotein” (VLDL) com origem hepática. Já o outro grupo é constituído por lipoproteínas ricas em colesterol, como as lipoproteínas de baixa densidade “low density lipoprotein” (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade “high density lipoprotein” (HDL). As albuminas não participam do grupo das lipoproteínas, mas são incluídas como transportadoras de ácidos graxos no sangue (Stryer, 1996, Sposito et al., 2007).

5.2.2. METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS

A gordura é ingerida em sua maior porção como triglicérides. Após a sua ingestão, as triglicérides passam por um processo de hidrólise realizado pelas lipases pancreáticas, sendo transformados em ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos. Os sais biliares presentes na luz intestinal emulsificam esses lipídios oriundos da dieta e da circulação hepática, dando origem às micelas, facilitando assim seu transporte pela borda em escova do epitélio intestinal (Xavier et al., 2013).

No interior do epitélio intestinal os lipídios, principalmente os ácidos graxos, são utilizados para a produção dos quilomícrons, tendo em sua conformação as apolipoproteínas B-48 e B-100. Depois os quilomícrons são secretados no sistema linfático chegando ao sistema circulatório e entrando no ducto torácico. No sistema circulatório, os quilomícrons sofrem hidrólise pela lipase lipoproteica, enzima essa que se localiza na parede endotelial dos capilares do tecido adiposo e muscular. Esse processo de hidrólise libera os ácidos graxos, o glicerol livre e o colesterol não esterificado na superfície do endotélio. Os ácidos graxos são absorvidos pelas células musculares e adipócitos, sendo convertidos em tecido de armazenamento de triglicérides.

Os remanescentes dos quilomícrons e ácidos graxos são absorvidos pelo fígado e são utilizados para a formação de VLDL (Xavier et al., 2013). O colesterol livre quando presente na via intracelular é esterificado por meio da enzima acil-colesterol-acil transferase (ACAT), migrando para a membrana celular. Na membrana celular, as VLDL fazem a troca das triglicérides pelos ésteres de colesterol com as HDL e LDL, pela ação da proteína de transferência de colesterol esterificado ou “cholesterol ester transfer protein” (CETP).

Esse colesterol livre presente nas HDL sofre o processo de esterificação pela ação da lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT), que possui como cofator a apolipoproteína A-I. Isso é essencial para o HDL, possibilitando sua estabilização e transporte. A HDL também possui função de proteção do leito vascular contra a aterosclerose. Esse mecanismo ocorre pela remoção de lipídios oxidativos da LDL, pela inibição das moléculas de adesão e monócitos no endotélio e pela estimulação da liberação de óxido nítrico (Olson, 1998).

5.2.3. METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS NO FÍGADO

O transporte dos lipídios por via hepática é realizado através das VLDL e LDL. As VLDL são proteínas ricas em triglicérides e contêm a apo B-100 como sua apolipoproteína principal. As VLDL são metabolizadas no fígado, sendo necessário uma ação da proteína de transferência de triglicérides microsomal ou “microsomal triglyceride transfer protein” (MTP), levando os triglicérides até a apo B-100. Após sua formação a VLDL é eliminada na circulação periférica, sofrendo hidrólise pela lipase lipoproteica, disponibilizando os ácidos graxos para que possam ser utilizados como armazenamento pelo tecido adiposo ou servindo de fonte energética para o tecido muscular. Os remanescentes das VLDLs são removidos pelo tecido hepático ou sofrem uma hidrólise contínua até a formação das LDLs, após a perda da apo E, que possuem uma meia vida longa no plasma (Xavier et al., 2013).

Aproximadamente 50% das VLDL são catabolizadas no fígado e o restante é transformado em LDL no plasma. A LDL possui pequena quantidade de triglicérides e é composta quase que por completo em colesterol e apo B-100. Essa lipoproteína é removida no fígado pelos receptores B/E. A expressão desses receptores é o principal responsável pelo nível de colesterol plasmático, dependendo da ação enzimática de hidroximetilglutaril (HMG) CoA redutase. A LDL é uma fonte de colesterol, atendendo os requisitos extra-hepáticos para a síntese de membranas e hormônios esteroides (Grundy, 1996).

5.2.4. LDL e HDL

A LDL possui em sua composição um resíduo de triglicérides, tendo o colesterol como seu principal constituinte e a apo B-100. Elas são capturadas pelas células hepáticas e periféricas através do receptor de LDL (LDL-R). No interior das células o colesterol livre resultante dos LDLs sofre o processo de esterificação pela ação da enzima acil-CoA:colesteril aciltransferase (ACAT) (Xavier et al., 2013).

As HDL são formadas no tecido hepático, no intestino e na circulação, possuindo em sua composição as apos A-I e A-II, e baixo conteúdo lipídico. Ela é distribuída através da circulação sanguínea e linfática. As principais funções desta lipoproteína são de coletar o colesterol livre das membranas, esterificar e transportar esse colesterol de volta para o fígado através dos receptores SR-B1 presentes no tecido hepático. A apo A-I é o cofator da enzima lecitina-colesterolaciltransferase (LCAT). Essa enzima é responsável pela esterificação do colesterol livre originário das membranas celulares (Garcia e Oliveira, 1992).

A via de transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o tecido hepático é chamada de transporte reverso do colesterol. A ação do complexo “ATP binding cassette A1” (ABC-A1) tem grande importância neste processo, pois facilita a extração do colesterol das células, por meio das HDLs. A HDL também tem outras ações que contribuem para a proteção da parede vascular, contra a aterogênese, através da remoção de lipídios oxidados da LDL, a inibição da fixação de moléculas de adesão dos monócitos ao endotélio e pela estimulação da liberação de óxido nítrico (Xavier et al., 2013).

5.2.5. DISLIPIDEMIAS NA SME

Dislipidemia é um distúrbio dos níveis de lipídios e lipoproteínas plasmáticas, podendo ser denominadas de hiperlipidemia ou hiperlipoproteinemia. Essa anormalidade pode ser considerada como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças como a síndrome metabólica e a resistência à insulina (Xavier et al., 2013).

A obesidade em equinos pode ser associada ao aumento dos valores plasmáticos de insulina e lipídios, e essa elevação pode estar correlacionada ou sobre influência das citocinas circulatórias. Tem sido observado em ratos que os lipídios plasmáticos alteram a expressão da IL-6 e TNF (Ajuwon e Spurlock, 2005, Treiber et al., 2006, Carter et al, 2009).

O aumento de lipídeos circulantes nos equinos é uma resposta fisiológica para mobilizar as reservas energéticas das reservas de gordura presentes no organismo do animal. Os fatores considerados como desencadeadores desse processo são quadros de estresse e falha na manutenção da homeostase energética. Isso ocorre por meio de mecanismos como o aumento da produção de hormônio corticotrópico, hormônio do crescimento, catecolaminas, glicocorticoide e glucagon. Tais alterações favorecem a supressão da produção da insulina, tornando o animal intolerante à glicose. Como consequência ocorrem a lipólise, a glicogenólise e o catabolismo de proteínas (Durham, 2008, McKenzie, 2011).

O acúmulo de quilomícrons e de VLDL no plasma é considerado hipertrigliceridemia. Isso ocorre como consequência à diminuição da hidrólise dos triglicérides da VLDL pela lipase lipoproteica ou pelo aumento de sua produção. A hipercolesterolemia é o aumento das lipoproteínas ricas em colesterol como a LDL no plasma, sendo resultado de doenças monogênicas como o defeito do gene receptor de LDL ou no gene apo B-100 em humanos (Sposito et al., 2007).

Em equinos a hiperlipidemia clássica é o aumento da concentração dos triglicérides plasmáticos com valores até 500 mg/dL. Quadros clínicos de hiperlipidemia são comumente observados em pôneis ou asininos que passaram por uma restrição alimentar, quadros de prenhes, lactação ou doenças que levam à anorexia (Schotman e Kroneman, 1969, Naylor, 1982).

Quando ocorre um fator ou a associação de vários fatores causadores de hiperlipidemia em equinos, as triglicérides presentes no tecido adiposo são liberadas na circulação e metabolizadas em ácidos graxos livres e glicerol, sendo liberados para a corrente sanguínea. Esses ácidos graxos livres e as lipoproteínas, originárias da conversão dos ácidos graxos livres, acabam ficando em excesso na circulação, dificultando os mecanismos homeostáticos que regulam o metabolismo energético.

Dentre os mecanismos homeostáticos afetados, observa-se a interferência nas ações da insulina, suprimindo a atividade do hormônio sensível a lipase (HSL). O resultado é o aumento da lipólise nos tecidos, que tem como consequência a piora no quadro de hipertrigliceridemia. Também pode ocorrer acúmulo dos ácidos graxos livres e das lipoproteínas no tecido muscular e hepático, causando resistência à insulina. Este mecanismo tem como consequência a diminuição da captação de glicose por esses tecidos, interferindo na gliconeogênese hepática (Jeffcot e Field, 1985, McKenzie, 2011).

Em muitos estudos, em que as mensurações das concentrações de lipídios plasmáticos foram realizadas em equinos obesos, os valores de triglicérides e colesterol total não diferiram entre o

grupo controle com o grupo de animais hiperinsulinêmicos. Contudo, correlação positiva entre concentrações plasmáticas de insulina e triglicérides tem sido documentadas em equídeos com casos naturais de hiperlipidemia (Freestone et al., 1992, Forhead et al., 1994, Frank et al., 2006).

Frank et al. (2006) observaram elevações nos valores plasmáticos de VLDL – triglicérides (P=0,019), VLDL (P=0,012), HDL (P= 0,029) e AGNE (P=0,028) em equinos obesos com resistência à insulina quando comparados ao grupo de animais não obesos.

Em humanos tem sido observada uma elevação dos AGNE na obesidade e no sedentarismo. Essa elevação pode ser relacionada à saturação da capacidade de armazenamento de AGNE nos adipócitos e aos efeitos inibitórios da insulina na hormônio-reposta da lipase. Dessa forma, haveria aumento da concentração dos ácidos graxos nos tecidos e acúmulo dos diacilgliceróis nas células. Tal fenômeno pode ser denominado como lipotoxicidade e ocorre porque os lipídios presentes no meio intracelular irão exercer efeito na sinalização dos receptores de insulina nos miócitos ou nas células β do pâncreas (Boden e Laakso, 2004, Frank et al., 2006).

O aumento da concentração de VLDL em equinos tem sido associada à privação de alimentação e hiperlipidemia em animais que apresentaram elevação dos valores plasmáticos de AGNE. A elevação de VLDL pode ser uma resposta à uma maior absorção de ácidos graxos pelo fígado, aumentando a disponibilidade de triglicérides para a síntese do VLDL (Watson et al., 1992, Frank et al., 2006). Altas concentrações e HDL em equinos obesos tem sido associadas à maior atividade da lipase lipoproteica, enzima responsável pela transferência do colesterol da VLDL em excesso para o HDL (Watson et al., 1993, Geelen et al., 2001).

6. LAMINITE EM EQUINOS

A laminite é a mais grave doença observada no casco dos equinos, sendo responsável por alterações anatômicas e fisiológicas que promovem perda da função. Em um estudo epidemiológico realizado no Reino Unido, foi observado que a prevalência de laminite é de 0,5 caso/100 equinos/ano, sendo mais observada nos dois membros torácicos (Wylie et al., 2013).

Existem evidências de que os equinos já apresentavam lesões características da laminite a milhões de anos antes de serem domesticados, sendo observadas alterações sugestivas de laminite crônica em até 75,25% dos fósseis estudados. Entre esses animais foram constatadas lesões consistentes de laminite crônica severa em 6,08%. As lesões mais observadas foram rugosidade dos sítios de fixação tendíneas e do tecido laminar, com proliferação e alargamento vascular anormal, com cerca de um terço das falanges distais analisadas com considerável remodelação óssea (Walleit, 2013).

A laminite pode ser definida como o enfraquecimento ou a falha da ligação entre a falange distal com a parede interna do casco. Isso comumente ocorre pelo dano da arquitetura do tecido lamelar da parede interna do casco, que tem como função fixar a falange distal na superfície interna da cápsula do casco. Nessa situação a massa corpórea do animal e as forças originadas pela locomoção deslocam a terceira falange no sentido distal, danificando o cório da sola. Também, pela ação do tendão flexor profundo, a falange distal rotaciona em torno de seu eixo lateromedial (transverso), fazendo com o que a pinça da falange migre em direção à sola e que o processo extensor migre em direção à borda coronária dorsal. O animal com laminite apresenta um quadro de dor de grande magnitude e sinais de claudicação característicos dessa afecção (Pollitt, 2008).

O enfraquecimento dessa conexão tem sido relacionada à lesão da membrana basal e à perda de seus hemidesmossomos, comprometendo a união entre a lâmina densa da membrana basal com as células epidérmicas. A membrana basal está localizada entre as lâminas dérmicas e epidérmicas, fixando a falange distal à parede do casco (Pollitt e Daradka, 1998, French e Pollitt, 2004). A membrana basal é um componente da matriz extracelular (MEC) que liga o tecido dérmico da falange distal com as células epidérmicas basais da parede do casco. A membrana basal é uma estrutura complexa composta de colágenos tipo IV e VII, glicoproteínas como a laminina, que formam filamentos de ancoragem que juntamente com os hemidesmossomos, auxiliam na aderência da membrana basal com as células epidérmicas basais (Pollitt, 1996).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) formam a família de proteinases dependentes de zinco, envolvidas na degradação fisiológica e patológica da matriz extracelular (Mignatti e Rifkin, 1993). As MMP2 (gelatinase A) e MMP9 (gelatinase B) são capazes de degradar o colágeno tipo IV, um dos principais constituintes da membrana basal lamelar do casco (SATO et al., 1994). Kyaw-Tanner e Pollitt (2004) observaram grande quantidade de MMP-2 e MMP-9 nos tecidos lamelares de equinos acometidos por laminite. Giannelli et al. (1997) constataram que componentes da membrana basal, como a laminina, são substratos para os MMPs.

Existem diversas teorias que tentam elucidar a etiopatogenia da laminite em equinos, a enzimática, a vascular, a trombogênica, a inflamatória e a metabólica. Entretanto fica claro que existe uma relação entre essas teorias, demonstrando que essa afecção pode possuir característica multifatorial (HOOD, 1999, Johnson, 2002, Moore, Belknap, 2009, Laskoski, 2009).

A teoria enzimática é baseada na degradação do colágeno presente no tecido laminar, após uma ação exacerbada das MMPs. O estímulo de sua ação exarcebada pode ser explicado após a ação de enzimas bacterianas absorvidas no sistema digestório e também pela ação de citocinas inflamatórias originárias de processos inflamatórios sistêmicos como o fator de necrose tumoral alfa (TNF – α). Entre as toxinas bacterianas responsáveis pela ativação dos MMPs pode-se citar as exotoxinas originárias dos *Streptococos*, principalmente a *Streptococcus bovis*, presentes no sistema digestório dos equinos. As MMPs também podem ser liberadas pelos leucócitos que migraram para os tecidos laminares (Pollitt, 1996, Han et al., 2000; Han et al., 2001, Belknap et al., 2007).

A teoria vascular é baseada na hipótese de que a vasoconstrição digital e a criação de anastomoses arteriovenosas no tecido venoso do casco podem acarretar lesões do tecido laminar por meio da estase sanguínea, resultando assim em edema do tecido e por fim em necrose. Existem evidências de que a vasodilatação é observada no início dos quadros de laminite experimental por um período de 12 a 40 horas após à sobrecarga de carboidrato, contrastando com a teoria vascular. Mas o que tem sido observado é que a vasoconstrição está presente após o envolvimento de mediadores inflamatórios sistêmico devido à ação da citocinas e também em quadros da laminite metabólica através da ação da insulina sobre o óxido nítrico, demonstrando que a laminite possui características multifatoriais (Noschaka et al., 2009, Bailey et al., 2008, Allen et al., 1990; Keen et al., 2008).

A teoria trombogênica é baseada na ação da agregação e adesão plaquetária sobre o endotélio íntegro, associada a equinos após quadros de abdômen agudo. Foi observado a formação de microtrombos na parede dos vasos presentes no tecido laminar do casco em animais com laminite com redução do fluxo sanguíneo para o casco (Weiss et al., 1995).

A teoria inflamatória é fundamentada na ação de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e infiltração leucocitária no tecido. O processo inflamatório sistêmico pode ser decorrente de um processo infeccioso, por ação de endotoxinas ou pela injúria do tecido após um quadro de síndrome cólica por exemplo (Hurley et al., 2006, Loftus et al., 2009, Noschka et al., 2009, Faleiros et al., 2009). Após o início do processo inflamatório ocorre a liberação de mediadores inflamatórios que vão atuar na estrutura de proteínas e carboidratos promovendo quadro de estresse oxidativo (Halliwell, 1989, Campos e Yoshida, 2004).

A teoria endocrinometabólica tenta explicar a laminite associada a problemas endocrinológicos e metabólicos como a DPPI, a SME e a administração de glicocorticóides. A laminite originária dessas síndromes pode ser chamada de laminite endocrinopática. Todas essas alterações são associadas com distúrbio da regulação da insulina com a glicose (McGowan, 2010). Tem sido observada disfunções endócrinas em 90% dos cavalos que desenvolveram laminite primária (Donaldson et al., 2004, Karikoski et al., 2011). Os mecanismos envolvidos nessa teoria estão detalhados mais adiante.

De modo geral, os principais fatores de risco que um equino pode apresentar para desenvolver essa afecção são peso, idade, escore corporal (> 6), tipo de atividade física e o uso de analgésicos (Orsini, et al., 2013). Entretanto, com relação à laminite endocrinopática, devem ser considerados a concentração plasmática de triglicérides acima de 570 mg/l, os valores de sensibilidade à insulina através do proxie $RISQI < 0,32 \mu\text{u}/\text{l}^{-0,5}$ e $MIRG > 5,6 \mu\text{u}_{\text{insulina}}^2/[10 \cdot \text{l} \cdot \text{mg}_{\text{glucose}}]$, valor de insulina plasmática > 32 $\mu\text{u}/\text{l}$, a concentração plasmática de leptina > 73 ng/ml, escores de deposição de gordura na crista do pescoço > 4 (Carter et al., 2009, Borer et al., 2012a, Borer et al., 2012b).

6.1.LAMINITE ENDOCRINOÁTICA EM EQUINOS

Laminite endocrinopática pode ser definida como a laminite que possui como agente causadoras influências hormonais associadas à processos inflamatórios e alterações intestinais (McGowan, 2010). Existem duas condições que podem desencadear esse tipo de laminite:

1. Glicocorticoides: originário da Disfunção da Pituitária Pars Intermédia (DPPI) ou por origem iatrogênica;
2. Resistência à insulina: originária da Síndrome Metabólica Equina ou por meio da laminite associada à gramínea.

6.1.1. LAMINITE ASSOCIADA AOS GLICOCORTICOIDES

Os quadros de laminite de origem iatrogênica causados pela administração de glicocorticoides podem ser atribuídos à capacidade dos corticosteroides de induzir resistência à insulina. Uma única dose de triancinolona (0,05 mg/kg) pode induzir um quadro de hiperglicemia por um período de até 3 dias e uma dose elevada de 0,2 mg/kg pode levar a hiperglicemia e hiperinsulinemia por até 6 dias. O mesmo pode ser observado quando administrados dexametasona durante 3 semanas na dose de 0,08 mg/kg/48horas (Jornson et al., 2004, French e Pollitt, 2000, Tiley, Geor, 2008).

A DPPI é uma consequência da hiperplasia ou de uma neoplasia da “pars intermedia”. O fator determinante para desenvolvimento de laminite em equinos com DPPI é o hiperadrenocorticismo, com a produção e secreção em excesso da adrenocorticotropina (ACTH), interferindo na resposta da insulina e promovendo hiperinsulinemia e resistência à insulina. Essa alteração da resposta da insulina é decorrente ao excesso da ação do cortisol (McGowan et al., 2004, McGowan, Neiger 2003). O ACTH estimula a secreção de cortisol das glândulas supra-renais (Schott, 2002, Miller et al., 2008).

A DPPI é uma afecção comum em equinos idosos, podendo afetar até 15% dos animais com 15 anos ou mais de vida. As chances desses animais desenvolverem DPPI aumenta em 20% para cada 1 ano a mais de vida. Entre esses animais que apresentam a DPPI, a chance de desenvolver laminite pode ser entre 50 a 80%, com uma correlação alta com o ACTH elevado (Schott et al., 2001, Donaldson et al., 2004, McGowan et al., 2007, Tadros e Frank 2013).

O hiperadrenocorticismo pode induzir alterações vasculares. Em humanos, é relatado redução da vasodilatação da artéria braquial e remodelação hipertrófica das artérias nos tecidos subcutâneos. Esta informação, quando extrapolada para os equinos, pode representar deficiência na irrigação lamelar e redução na capacidade de regeneração (Rizzoni et al., 2009, Baykan et al., 2007). Alterações no comprimento de laminas primárias e secundárias tem sido relatada em equinos com hiperadrenocorticismo.

6.1.2. LAMINITE ASSOCIADA A SME

Atualmente já está confirmado que a insulina com valores supra fisiológicos por um período de 48 a 72 horas pode promover laminite em equinos saudáveis. Quando a insulina se encontra dentro de seus valores fisiológicos, preferencialmente, se liga aos receptores de insulina (RIns). No entanto, quando as concentrações de insulina estão elevadas, essa pode se ligar aos receptores do fator de crescimento da insulina também denominado como “insulin-like growth fator – 1 receptor” (IGF-1R) e/ou no receptor híbrido do RI/IGF -1R. Quanto maior a concentração da insulina, menos específica ela fica podendo ativar múltiplos receptores. Acredita-se que esse é um mecanismo implícito para o desenvolvimento da laminite endocrinopática (Asplin et al, 2007, Laat et al., 2010, Laat et al., 2013).

Sabe-se que a insulina possui alta afinidade por seus dois receptores de insulina, tanto o RIns-A e RIns-B. Por outro lado, possui baixa afinidade com o receptor de IGF-1. O receptor híbrido-B possui afinidade somente com o IGF-1 enquanto o receptor híbrido-A possui alta afinidade com o IGF -1 e IGF-2 e baixa afinidade com a insulina (Belfiore et al., 2009).

O receptor de insulina B (RIns-B) é considerado o mediador primário, ele é responsável pelas atividades metabólicas da insulina. Já o receptor de insulina A (RIns – A) é responsável por sua ação mitogênica e por funções anti-apoptóticas (Frasca et al., 1999, Denley et al., 2003). Os receptores do IGF-1 e os receptores híbridos são responsáveis por uma série de respostas biológicas, dentre elas o estímulo do crescimento celular, a adesão celular, a proliferação, a diferenciação celular e a apoptose (Chitnis et al., 2008).

A insulina tem ação de diminuir a expressão de seu receptor através de uma resposta negativa com a concentração da glicose, com o intuito de regular sua absorção. Por meio desse mecanismo, a diminuição da expressão dos RIns tem sido observada em animais que apresentam hiperinsulinemia e resistência à insulina. Em contrapartida, a elevação dos valores de insulina em

conjunto com a obesidade com uma dieta rica em ácidos graxos não esterificados elevam a expressão dos receptores de IGF-1. Também tem sido observado que animais com elevação dos valores de insulina plasmática apresentam um maior valor de IGF-1 livre circulante, podendo sugerir alteração das funções metabólicas da insulina com a glicose (Marshall et al., 1984, Kellerer et al., 1993, Hursting, 2014, Chi et al., 2000, Boucher et al., 2010, Burns et al., 2013).

Como já foi demonstrado no tecido lamelar dos equinos, existe grande quantidade de receptores para IGF-1, insulina tipo A e receptores híbridos. Em tese, quando equinos apresentam hiperinsulinemia, a insulina em altas concentrações pode estimular os fatores de crescimento, aumentar a adesão celular em detrimento de suas ações metabólicas, tornando assim um fator ativador do processo da laminite (Kullmann et al., 2016).

Durante a fase de desenvolvimento da laminite induzida por insulina, observa-se proliferação das células do tecido laminar, que praticamente inexistem em animais saudáveis. Essa proliferação em excesso das células basais do tecido laminar secundário do casco pode enfraquecer o aparato de sustentação lamelar, podendo desencadear o desenvolvimento da laminite endocrinopática (Laat et al., 2013, Daradka e Pollitt, 2004).

Além da ação em cima de receptores para fatores de crescimento, outros mecanismos têm sido postulados como importantes na laminite endocrinopática. Um deles se baseia no fato do tecido adiposo poder secretar citocinas inflamatórias no sistema circulatório dos equinos, como o TNF – α , adipocina e leptina, promovendo um estado inflamatório persistente. Essa situação pode contribuir para o desenvolvimento de laminite nos animais obesos.

Por outro lado, sabe-se que um longo período de hiperinsulinemia pode resultar em importantes disfunções hemodinâmicas. A insulina possui propriedades vaso reguladoras, pois estimula a síntese de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais, promovendo vasodilatação. No entanto, a insulina também promove vasoconstrição, por meio da síntese da endotelina 1 (ET-1) e pela ativação do sistema simpático (Muniyappa et al., 2007).

Em condições normais as ações opostas do NO (vasodilatação) e da ET-1 (vasoconstrição) estão equilibradas devido as duas vias de sinalização da cascata da insulina. O receptor de insulina estimula as duas diferentes vias de sinalização no interior do endotélio vascular. O NO é secretado quando a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é ativada e a ET-1 é ativada quando a via da proteína quinase mitogênica é ativada (MAPK) (Muniyappa et al., 2008).

Quando o equino apresenta RI, a via PI3K é interrompida, comprometendo a capacidade de vasodilatação do animal, enquanto que a via MAPK permanece totalmente funcional. O resultado final é a predominância da vasoconstrição. Já quando o animal está com hiperinsulinemia compensatória em resposta à RI, a via de sinalização de MAPK é estimulada, aumentando a síntese de ET-1 (Kim et al., 2006). Desta forma, animais com RI crônica podem ser mais propensos a desenvolver laminite também por meio de vasoconstrição (Tadros e Frank, 2013). Ainda mais sabendo-se que a vasoconstrição contribui também com a ativação plaquetária e a adesão leucocitária (Bailey et al., 2004, Kim et al., 2006, Eades et al., 2007, Milinovich et al., 2010, Eades, 2010).

Tais alterações poderiam promover hipóxia lamelar, super-ativação de pró-enzimas metaloproteínases e finalizando com uma lesão no tecido laminar do casco. Carter et al. (2010) observaram a expressão de 17 proteínas lamelares diferentes do grupo controle em equinos que

passaram pelo tratamento prolongado de clamp euglicêmico hiperinsulinêmico. A diferença na expressão dessas proteínas é indicativa que está ocorrendo um aumento da translocação, resposta imune, estresse oxidativo, proliferação celular e diminuição da modificação da pós-transdução e estruturação das proteínas das células de adesão (Baron, 2002, Asplin et al., 2007).

Por outro lado, Asplin et al (2007) e Laats et al (2010) observaram que, após a indução de hiperinsulinemia, os equinos apresentaram sinais de laminite com grau 2 de Obel aumento da temperatura da parede do casco. Tais fatos indicam que ocorreu uma vasodilatação no tecido laminar do casco, sugerindo que a laminite foi induzida por meio do mecanismo de vasodilatação, podendo significar que a vasodilatação induzida pela hiperinsulinemia superaria a vasoconstrição causada pela resistência à insulina.

Laats (2010) e colaboradores teorizaram que a vasodilatação poderia desencadear um quadro de laminite por meio do aumento do fornecimento de glicose para os tecidos, promovendo a glicotoxicidade local do casco, causando a formação de produtos finais da glicação que podem danificar os tecidos (Yamagishi, 2009).

O tecido do casco não é insulino dependente, não necessitando de insulina para aproveitar a glicose. No casco ocorrem os receptores GLUT-1 como cadeias transportadoras de glicose, demonstrando que a diminuição da captação de glicose pelo casco é uma causa improvável para o desenvolvimento da laminite. Já o aumento da capacidade de captar a glicose é uma alternativa para a elucidação para a patologia desta afecção (Clark et al., 2003, Asplin et al., 2007).

Corroborando essa teoria, estudos em humanos demonstraram que a vasodilatação é intimamente associada ao metabolismo da glicose, sendo possível que a captação de glicose através do GLUT-1 no tecido laminar esteja aumentada em animais com hiperinsulinemia. Isso ocorre devido ao aumento da perfusão vascular, resultando na patologia laminar causada por glicotoxicidade. Em humanos diabéticos observa-se um aumento da endoteliopatia glicotóxica através dos AGEs e pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que prejudica a defesa antioxidante e ocasiona uma disfunção microvascular (Asplin et al., 2007; Clark et al., 2003; Mather et al, 2000; Yuan et al., 2007; Uemura et al., 2001).

A ação da glicotoxicidade em pacientes com RI pode ocasionar alterações vasculares, em decorrência da atividade pró-coagulante e pelo dano oxidativo do endotélio, tendo como consequência danos vasculares, isquemia e efeitos pró-inflamatórios que podem estimular a ação das metaloproteinases (McGowan et al., 2007).

A glicotoxicidade é mediada pela proteína glicosilada, originando os AGEs. Os AGEs são formadas através das reações não enzimáticas irreversíveis (reação de Maillard) entre os carboidratos, proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos, formando grupos de aminas livres (Singh et al., 2001). O acúmulo dos AGEs pode modular as funções celulares, causando o aumento da sinalização da transdução dos receptores conhecidos como RAGE (Bucciarelli et al., 2002). A ligação dos AGEs com os receptores RAGE estimula a migração de citocinas pró inflamatórias e desencadeia o estresse oxidativo, trombose e o aumento da expressão de várias proteínas de matriz extracelular (MEC) como o colágeno e a laminina. Assim, a ação dos AGEs também poderia ser relevante no desenvolvimento crônico da laminite endocrinopática (Brownlee, 1992, Simm et al., 2004, Gawłowski et al., 2009, Sick et al., 2010).

Por fim, outra proposta para a fisiopatologia da laminite endocrinopática seria pelo excesso de peso desses animais, promovendo sobrecarga na interface dermo-epidérmico (Tadros e Frank, 2013). Entretanto, o mais provável é que ocorram as alterações observadas em todas as teorias acima citadas em conjunto, demonstrando que a patofisiologia da laminite endocrinopática possui natureza complexa e multifatorial.

6.1.3. ALTERAÇÕES DA ARQUITETURA LAMELAR DO CASCO COM LAMINITE ENDOCRINOPÁTICA

As alterações no tecido lamelar primário e secundário descritas em equinos com laminite endocrinopática associada à hiperinsulinemia não apresentam lesões extensas na membrana basal (MB), nesses casos não há desintegração generalizada da membrana basal. E ocorre mínima infiltração de neutrófilos, se diferenciando das alterações histopatológicas observadas nos casos de laminite de origem inflamatória (Pollitt, 1996, Asplin et al., 2010, Karikoski et al., 2014).

As lesões microscópicas observadas nos animais com laminite endocrinopática crônica são localizadas predominantemente na porção abaxial do tecido lamelar primário, sendo observadas fusão lamelar, hiperplasia epidérmica, disqueratose e apoptose. Também foi observada separação lamelar (não exclusiva da MB). Em quadros com características agudas, na porção axial o tecido epidérmico lamelar apresentou formatos afilado, alongados e aumento da apoptose. Também foi observado aumento da atividade mitótica na fase aguda em modelos experimentais de hiperinsulinemia (Asplin et al., 2010, Laat et al., 2011, Karikoski et al., 2015).

A severidade das lesões observadas em casos naturais não foi correlacionada com a duração da laminite. Os achados sugerem que a fase pré-clínica de desenvolvimento da lesão pode ser demonstrada pelos anéis de crescimento divergentes nos cascos, que foram observados antes do início da claudicação (Karikoski et al., 2015).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E. D.; SHEPHERD, P. R.; KAHN, B. B. Glucose transporters and pathophysiologic states. In: LE ROITH, D.; TAYLOR, S. I.; OLEFSKY, J. M. (Eds). Diabetes mellitus: A fundamental and clinical text. Philadelphia:Lippincott- Raven, 1996,530-543p.

AJUWON, K. M.; SPURLOCK, M. E. Palmitate activates the NFκB transcription factor and induces IL-6 and TNFα expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.*, v. 135, p. 1841–1846, 2005.

ALLAN, F. J.; PFEIFFER, D. U.; JONES, B. R.; et al. A cross-sectional study of risk factors for obesity in cats in New Zealand. *Prev. Vet. Med.*, v. 46, n. 3, p. 183-196, 2000.

ALLEN, D. J.; CLARK, E. S.; MOORE, J. N.; PRASSE, K. W. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 51, p. 1930-1934, 1990.

ALVES A.L.G.; FONSECA B.P.A.; THOMASSIAN A.; et al. Lombalgia em Equinos. *Br. J. Vet. Res. An. Sc.*, v.44, n.3, p.191-199, 2007.

- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev. Bra. Epid.*, v. 6, n. 2, p. 158 – 170, 2003.
- ASPLIN, K. E.; SILLENCE, M. N.; POLLITT, C. C.; MCGOWAN, C. M. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *Vet. J.*, v.174, p. 530-535, 2007.
- ASPLIN, K. E.; PATTERSON-KANE, J. C.; SILLENCE, M. N.; et al. Histopathology of insulin-induced laminitis in ponies. *Equine Vet. J.*, v. 42, p. 700-706, 2010.
- BAILEY, S.R.; MENZIES-GOW, N.J.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. The effects of vasoactive amines found in the equine hindgut on digital blood flow in the normal horse. *Equine Vet. J.*, v. 36, p. 267–272, 2004.
- BAILEY, S. R.; HABERSHON-BUTCHER, J. L.; RANSOM, K. J.; et al. Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 69, n. 1, p. 122-129, 2008.
- BARON, A.D. Insulin resistance and vascular function. *J. Diab. Comp.* v. 16, p. 92-102, 2002.
- BARROS, G.S.C.; LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: CEPEA/FEALQ, 2006. 246p.
- BAXTER, G. M. Acute laminitis. *Vet. Clin. N. Am.*, v.3, p.627-642, 1994.
- BAYKAN, M.; EREM, C.; GEDIKLI, O.; et al. Impairment of flow-mediated vasodilatation of brachial artery in patients with Cushing's Syndrome. *Endocrine*, v. 31, p. 300-304, 2007.
- BELFIORE, A.; FRASCA, F.; PANDINI, G.; et al. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* v. 30, p. 586-623, 2009.
- BERTIN, F.R.; SOJKA-KRITCHEVSKY, J.E. Comparison of a 2-step insulin-response test to conventional insulin-sensitivity testing in horses. *Domes. An. Endocrinol.*, v. 44, p. 19-25, 2013.
- BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, v. 46, p.3-10, 1997.
- BODEN, G.; LAAKSO, M. Lipids and glucose in type 2 diabetes: what is the cause and effect? *Diabetes Care*, v. 27, p. 2253–2259, 2004.
- BORER, K.E.; BAILEY, S.R.; MENZIES-GOW, N.J.; et al. Use of proxy measurements of insulin sensitivity and insulin secretory response to distinguish between normal and previously laminitic ponies. *Equine Vet. J.*, v. 44, p. 444-448, 2012a.
- BORER, K. E.; BAILEY, S. R.; MENZIES-GOW, N.J.; et al. Effect of feeding glucose, fructose, and inulin on blood glucose and insulin concentrations in normal ponies and those predisposed to laminitis. *J. Anim. Sci.*, 2012b.

- BORGIA, L.; VALBERG, S.; MCCUE, M.; et al. Glycaemic and insulinaemic responses to feeding hay with different non-structural carbohydrate content in control and polysaccharide storage myopathy-affected horses. *J. An.Physiol. An. Nut.*, v. 95, p. 798-807, 2011.
- BOSTON, R.; NICHOLAS, F. Insulin dysregulation diabetes mellitus, and equine metabolic syndrome: lessons learned from modeling glucose and insulin dynamics in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. v. 33, p. 841, 2013.
- BOUCHER, J.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors act as ligand-specific amplitude modulators of a common pathway regulating gene transcription. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p. 17235-17245, 2010.
- BROJER, J.; LINDASE, S.; MULLER, C.; NOSTELL, K. Comparison between the euglycemic – hiperinsulinemic clamp and the use of proxies for determinations of insulin sensitivity in horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 57, n. 1, p. 3, 2015.
- BROWNLEE, M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*, v. 15, p. 1835–1843, 1992.
- BUCCIARELLI, L.G.; WENDT, T.; RONG, L.; et al. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, p. 1117–1128, 2002.
- BURNS, T. A.; GEOR, R. J.; MUDGE, M. C.; et al. Proinflammatory Cytokine and Chemokine Gene Expression Profiles in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Depots of Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Light Breed Horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 24, p. 932 – 939, 2010.
- BURNS, T.A.; WATTS, M.R.; WEBER, P.S.; et al. Distribution of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in the digital laminae of mixed-breed ponies: na immunohistochemical study. *Equine Vet. J.*, v. 45, p. 326-332, 2013.
- CALTABILOTA, T.J.; EARL, L.R.; Thompson, D. L.; et al. Hyperleptinemia in mares and geldings: assessment of insulin sensitivity from glucose responses to insulin injection. *J. Anim. Sci.*, v. 88, p. 2940-2949, 2010.
- CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *J. Vasc. Bra.*, v. 3, n. 4, 2004.
- CARTER, R. A.; GEOR, R. J.; STANIAR, W. B.; et al. Apparent adiposity assessed by standardized scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *The Vet. J.*, v. 179, p. 204 – 210, 2009.
- CARTER, R. A.; MEGEE, S.; ENGILES, J.; et al. Cellular Proliferation Markers in Lamellar Tissue and Skin Measured by Indirect Immunofluorescence. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 30, n. 2, p. 104, 2010.

- CARTMILL, J.A.; THOMPSON, D. L. J. R.; STORER, W.A.; et al. Endocrine responses in mares and geldings with high body condition scores grouped by high vs. low resting leptin concentrations. *J. Animal Sci.* v. 81, p. 2311–2321, 2003.
- CARVALHEIRA, J.B.; RIBEIRO, E.B.; TELLES, M. M.; et al. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. *Diabetes*, v. 51, p. A41, 2002.
- CHALDAKOV, G. N.; STANKULOV, I. S.; HRISTOVA, M.; GHENEV, P. I. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr. Pharm. Des.*, v. 9, p. 1023-1031, 2003.
- CHAMPE, P. G.; HARVEY, R. A. Bioquímica ilustrada. 2º ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996, 446 p.
- CHI, M.M.; SCHLEIN, A.L.; MOLEY, K.H. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology.*, v. 141, p. 4784-4792, 2000.
- CHITNIS, M.M.; YUEN, J.S.; PROTHEROE, A.S.; et al. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin. Cancer Res.*, v.14, p. 6364-6370, 2008.
- CLARK, M.G.; WALLIS, M.G.; BARRETT, E.J.; et al. Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *Am. J. Phys. Endocrinology Metab.*, v. 284, p. E241-E258, 2003.
- CORREA, A. A. D.; CORREA, J. H. R. Bioquímica animal. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Guibenkian, 1985. 1249 p.
- CORRY, D.B.; TUCK, M.L. Selective aspects of the insulin resistance syndrome. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, v. 10, p. 507-514, 2001.
- CORTADELLAS O. Manual de Nefrologia e Urologia Clínica Canina e Felina, São Paulo: MedVet Ltda, 2012, 246p.
- COSENTINO, F.; LUSCHER, T.F. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, Suppl. 32, p. S54-S61, 1998.
- CYMBALUKM, N.F.; CHRISTISON, G.I. Environmental effects on thermoregulation and nutrition of horses. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, v. 6, n. 2, p. 355-372, 1990.
- DARADKA, M.; POLLITT, C.C. Epidermal cell proliferation in the equine hoof wall. *Equine Vet. J.*, v. 36, p. 236–241, 2004.
- DASU, M. R. et al. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes care*, v. 33, n. 4, p. 861-868, 2010.
- DE LA CORTE, F.D. et al. Glucose uptake in horses with polysaccharide storage myopathy. *Am. J. Vet. Res.*, v. 60, n. 4, p. 458-462, 1999.

de LAAT, M.A., MCGOWAN, C.M., SILLENCE, M.N.; POLLITT, C.C. Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Vet. J.*, v. 42, p. 129-135, 2010.

de LAAT, M.A.; VAN EPS, A.W.; MCGOWAN, C.M.; et al. Equine laminitis: comparative histopathology 48 hours after experimental induction with insulin or alimentary oligofructose in Standardbred horses. *J. Comp. Pathol.* v.145,p. 399-409, 2011.

de LAAT, M. A.; POLLITT, C. C.; KYAW-TANNER, M. T.; et al. A potential role for lamellar insulin-like growth factor-1 receptor in the pathogenesis of hyperinsulinaemic laminitis. *The Vet. J.* v. 197, p. 302-306, 2013.

de LAAT, M. A.; GRUNTMEIR, K. J.; POLLITT, C. C.; et al. Hyperinsulinemia down-regulates TLR4 expression in the mammalian heart. *Frontiers in Endocrinology.* v. 5, p. 1 – 8, 2014.

de LUCA, C. e OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* v. 582, p. 97–105, 2008.

DeFRONZO, R. A. e FERRANNINI, E. Insulin Resistance: A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Diabetes Care.* v. 14, n. 3, p. 173 – 194. 1991.

DENLEY, A.; WALLACE, J.C.; COSGROVE, L.J.; FORBES, B.E. The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm. Metab. Res.* v. 35, p. 778-785, 2003.

DIMITRIADIS, G.; LEIGHTON, B.; PARRY-BILLINGS, M.; et al. Effects of glucocorticoids excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, v. 321, p. 707–712, 1997.

DONALDSON, M.T.; LAMONTE, B.H.; MORRESEY, P.; et al. Treatment with pergolide or cyproheptadine of pituitary pars intermedia dysfunction (equine Cushing's disease). *J. Vet. Intern. Medicine.*, v. 16, n. 6, p.742–746, 2002.

DONALDSON, M.T.; JORGENSEN, A.J.; BEECH, J. Evaluation of suspected pituitary pars intermedia dysfunction in horses with laminitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 224, p.1123–1127, 2004.

DRUCKER, D.J. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol. Endocrinol.* v.17, p. 161-171, 2003.

DRUMOND, B.; GINELLI, A. M. G.; FALEIROS, R. R.; et al. Hoof capsule distortion and radiographic measurements of the front feet in Mangalarga Marchador horses subjected to athletic training. *Pferdeheilkunde.* v. 31, p. 110 – 118, 2016.

DURHAM, A. E.; RENDLE, D. I.; NEWTON, J. E. The effect of metformin on measurements of insulin sensitivity and beta cell response in 18 horses and ponies with insulin resistance. *Equine Vet Journal.* v. 40, p. 493–500, 2008.

EADES, S.C.; STOKES, A.M.; JOHNSON, P.J.; et al. Serial alterations in digital hemodynamics and endothelin-1 immunoreactivity, platelet-neutrophil aggregation, and concentrations of nitric oxide, insulin and glucose in blood obtained from horses following carbohydrate overload. *Am. J. Vet. Res.* v. 68, p. 87–94, 2007.

EADES, S.C. Overview of current laminitis research. *Vet. Clinical N. Am. Equine Pract.* v. 26, p.51–63, 2010.

EILER, H.; FRANK, N.; ANDREWS, F.M.; et al. Physiologic assessment of blood glucose homeostasis via combined intravenous glucose and insulin testing in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 1598–1604, 2005.

ENGELKING, L. R. Insulina, Ações e Degradação. Fisiologia Endócrina e Metabólica. Segunda edição. São Paulo: Roca, 2010, 114 – 118p.

FALEIROS, R. R. Obesidade em equinos. *Ver. Of. Raça Mangalarga Marchador*, v. 22, n° 71, p. 178 – 183, 2002.

FALEIROS, R. R.; NOUVO, G. J.; BELKNAP, J. K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. *J. Vet. Int. Medicine*, v. 23, n. 1, p.174-181, 2009.

FERGUSON, J.D. 1996. Implementation of a body condition scoring program in dairy herds. Feeding and managing the transition cow. In: Proceedings of the Pennsylvania Annual Conference, University of Pennsylvania, Center for Animal Health and Productivity, Kennett Square, PA.

FIRSHMAN, A.M.; VALBERG, S. J. Factors affecting assessment of insulin sensitivity in horses. *Equine Vet. J.*, v. 39, p. 567-575, 2007.

FISCHOEDER, A.; MEYBORG, H.; STIBENZ, D.; et al. Insulinaug ments matrix metallo proteinase-9 expressionin monocytes. *Cardiovascular Research.*, v. 73, p. 841–848, 2007.

FLAMMER, A. J.; LUSCHER, T. F. Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly.*, p. 140, 2010.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol. Rev.*, v. 62, p. 347-504, 1982.

FONSECA, V.; DESOUZA, C.; ASNANI, S.; et al: Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in diabetes. *Endocrin Vet.* v. 25, p. 153-175, 2004.

Food and Agriculture Organization - FAO. United Nations. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>> Acesso em: 20 jul. 2015.

FORHEAD, A. J.; FRENCH, J.; IKIN, P.; et al. Relationship between plasma insulin and triglyceride concentrations in hypertriglyceridaemic donkeys. *Res. Vet. Sci.*, v. 56p. 389–392, 1994.

FOWDEN, A. L. ; COMLINE, R. S.; SILVER, M. Insulin secretion and carbohydrate metabolism during pregnancy in the mare. *Equine Vet. J.*, v. 16, p. 239-246, 1984.

FRANK, N.; TADROS, E. M. Insulin dysregulation. *Equine Vet. J.*, v. 46, p. 102 -112, 2014.
FRASCA, F.; PANDINI, G.; SCALIA, P.; et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, v.19, p. 3278-3288, 1999.

FRANK, N.; ELLIOTT, S. B.; BRANDT, L. E.; KEISLER, D. H. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *JAVMA*, v. 228, n. 9, p. 1383 - 1390, 2006.

FRANK, N.; GEOR, R. J.; BAILEY, S. R.; et al. Equine Metabolic Syndrome. *J. Vet. Intern. Med. V.*, v. 24, p. 467 – 475, 2010.

FRANK, N. Equine metabolic syndrome. *Vet. Clinic No. Am. Equine Pract.*, v. 27, f. 1, p. 73–92, 2011.

FREESTONE, J. F.; BEADLE, R.; SHOEMAKER, K.; et al: Improved insulin sensitivity in hyperinsulinaemic ponies through physical conditioning and controlled feed intake. *Equine Vet. J.*, v. 24, p.187-190, 1992.

FRENCH, K.; POLLITT, C.C.; PASS, M.A. Pharmacokinetics and metabolic effects of triamcinolone acetonide and their possible relationships to glucocorticoid-induced laminitis in horses. *J. Vet. Pharmacol Ther.*, v. 23, n. 5, p. 287–292, 2000.

FRENCH, R. K.; POLLITT, C. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: a ultrastructural study. *Equine Vet. J.*, v. 36, n. 3, p. 230-236, 2004.

FULOP, T.; TESSIER, D.; CARPENTIER, A. The metabolic syndrome. *Pathologie Biologie (Paris)*, v. 54, p. 375–386, 2006.

GALANTINO-HOMER, H., LINARDI, R., ENGILES, J., et al., Investigating sérum biomarkers for equine laminitis. *J. Eq. Vet. Sci.*, v. 33, p. 863, 2013.

GARCIA, M. C.; BEECH, J. Equine intravenous glucose tolerance test: Glucose and insulin responses of healthy horses fed grain or hay and of horses with pituitary adenoma. *Amer. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 570-572, 1986.

GARCIA, R. C.; OLIVEIRA, H. C. F. Fisiologia as lipoproteínas. In: QUINTÃO, E. (Ed.). Colesterol e aterosclerose. Rio de Janeiro: Qulitymark, 1992. 1-30 p.

- GARCIA-SECO, E.; WILSON, D.A.; KRAMER, J.; et al. Prevalence and risk factors associated with outcome of surgical removal of pedunculated lipomas in horses: 102 cases (1987-2002). *J. Ame. Vet. Medical Ass.*, v. 226, n. 9, p.1529-1537, 2005.
- GARLINGHOUSE, S.E.; BURRILL, M.J. Relationship of body condition score to completion rate during 160 km endurance races. *Equine Vet. J. Suppl.*, v. 30, p. 591-595, 1999.
- GAWLOWSKI, T.; STRATMANN, B.; RUETTER, R.; et al. Advanced glycation end products strongly activate platelets. *Euro. J. Nut.*, v. 48, p. 475-481, 2009.
- GEELLEN, S. N.; JANSEN, W.L.; VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M.; et al. Fat feeding increases equine heparin-released lipoprotein lipase activity. *J. Vet. Intern. Med.* v. 15, p. 478-481, 2001.
- GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq. Bra. Endoc. Metabologia.*, v. 50, n. 2, p. 208 – 215, 2006.
- GENTRY, L.; THOMPSON, D.; GENTRY, G.; et al. The relationship between body condition score and ultrasonic fat measurements in mares of high versus low body condition. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 24, p. 198-203, 2004.
- GEOR, R. J.; THATCHER, C. D.; PLEASANT, R. S.; et al. Prevalence of hyperinsulinemia in mature horses: relationship to adiposity [abstract]. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 21, n. 3, p. 601, 2007.
- GEOR, R. J. Metabolic Predispositions to Laminitis in Horses and Ponies: Obesity, Insulin Resistance and Metabolic Syndromes. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 28, n. 12, p. 753 – 759, 2008.
- GEOR, R. J. Current Concepts on the Pathophysiology of Pasture-Associated Laminitis. *Vet. Clin. Equine.*, v. 26, p. 265-276, 2010.
- GEOR, R.J.; McCUE, M. E.; SCHULTZ, N. Current understanding of the equine metabolic syndrome phenotype. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 841-842, 2013.
- GEORGE, L. A.; STANIAR, W. B.; CUBITT, T. A.; et al. Evaluation of the effects of pregnancy on insulin sensitivity, insulin secretion, and glucose dynamics in Thoroughbred mares. *Am. J. Vet. Res.*, v. 72, p. 666-674, 2011.
- GERHARDT, C. C.; ROMERO, I. A.; CANCELLO, R.; et al. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 175, p. 81-92, 2001.
- GIANNELLI, G.; FALK-MARZILLIER, J.; SCHIRALDI, O.; et al. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*, v. 277, p. 225-228, 1997.
- GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol. Behav.*, v. 94, p. 206-218, 2008.

- GORDON, M. E.; MCKEEVER, K. H.; BETROS, C. L.; MANSO FILHO, H. C. Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin, and cortisol in horses. *Vet. J.*, v. 173, p. 532-540, 2007.
- GRUNDY, S. M. Dietary fat. In: ZIEGLER, E. E.; FILER JR., L. J. (Ed.). Present knowlegde in nutrition. 7. ed. Washington: ILSI, 1996. 44-57 p.
- HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulin e modulação por ácidos graxos. *Arq. Br. Endocrin. Metab.*, v. 45, n. 3 p. 219 – 227, 2001.
- HALLIWELL, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British J. Exp. Patho.*, v. 70; p. 737-5, 1989.
- HAYDEN, M. R.; TYAGI, S. C. Myocardial redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and congestive heart failure. *Med. Sci. Monit.*, v. 9, p. SR35-SR52, 2003.
- HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, v. 21, p. 897-909, 1983.
- HERNANDEZ, J.; HAWKINS, D. L. Training failure among yearling horses. *Am. J. Vet. Res.* V. 62, p. 1418-1422, 2001.
- HINTZ, H. F.; SCHRYVER, H. F.; STEVENS, C. E. Digestion and absorpion in the hindgut of nonruminant herbivores. *J. Anim. Sci.*, v. 46, p. 1803-1807, 1978.
- HOLMAN, G. D.; KASUGA, M. From receptor to transporter: Insulin signaling to glucose transport. *Diabetologia*, v. 40, p. 991-1003, 1997.
- HOOD, D.M. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. *Vet. Clin. N. Ame.: Equine Pract.*, v.15, n.2, p.325-343, 1999.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor alpha: A key component of the obesity/diabetes link. *Diabetes.*, v. 43, p. 1271-1278, 1994.
- HOUSEKNECHT, K. L.; SPURLOCK, M. E. Leptin regulation of lipid homeostasis: Dietary and metabolic implications. *Nutr. Res. Rev.*, v. 16, p. 83–96, 2003.
- HUNT, R.J. A retrospective evaluation of laminitis in horses. *Equine Vet. J.*, v.25, p.61- 64, 1993.
- HURLEY, D. J.; PARKS, R. J.; REBER, A. J.; et al. Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. *Vet. Immun. Immunoph.*, v. 110, n. 3-4, p. 195- 206, 2006.
- HURSTING, S. D. Obesity, energy balance, and cancer: a mechanistic perspective. *Cancer Treat. Res.* v. 159, p. 21-33, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da pecuária municipal. Disponível em: < ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/tabelas_pdf/tab01.pdf /> Acesso em: 8 jun. 2015.

JEFFCOTT, L. B.; FIELD, J. R. Current concepts of hyperlipaemia in horses and ponies. *Vet. Rec.*, v. 116, n. 17, p. 461-466, 1985.

JOHNSON, P. J.; TYAGI, S. C.; KATWA, L. C.; ET AL. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. *Vet. Rec.*, v. 142, p. 392-396, 1998.

JOHNSON, P. The equine metabolic syndrome peripheral cushing's syndrome. *Vet. Clin. Equine Pract.*, v. 18, p. 271-293, 2002.

JOHNSON, P. J.; MESSER, N. T.; GANJAM, V. K. Cushing's syndromes, insulin resistance and endocrinopathic laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 36, f. 3, p. 194-198, 2004.

JOHNSON, C. A. Glucose homeostasis during canine pregnancy: Insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. *Theriogenology.*, v. 70, p. 1418-1423, 2008.

JOHNSON, P. J.; WIEDMEYER, C. E.; MESSER, N. T.; GANJAM, V. K. Medical Implications of Obesity in Horses—Lessons for Human Obesity. *J. Diab. Sci. Technol.*, v.3, n.1, p.163-174, 2009.

JOHNSON, P. J.; WIEDMEYER, C. E.; LACARRUBBA, A.; et al. Diabetes, Insulin Resistance, and Metabolic Syndrome in Horses. *J. Diab. Sci. Technology.*, v. 6, f. 3, p. 534-540, 2012.

JUHAN-VAGUE, I.; MORANGE, P. E.; ALESSI, M. C. The insulin resistance syndrome: Implications for thrombosis and cardiovascular disease. *Pathoph. Haemost. Thromb.*, v.32, p. 269-273, 2002.

KAHN, C.R. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism*, v. 27, p. 1893-902, 1978.

KANE, R. A.; FISHER, M.; PARRETT, D.; LAWRENCE, L. M. Estimating fatness in horses. Proceedings of the 10th Equine Nutrition and Physiology Society Symposium; 1989; Fort Collins, CO. p.127-131.

KANEKO, J. J. Carbohydrate metabolism and its diseases. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 4th. San Diego:Academic Press Inc., 1989 p. 44-81.

KARIKOSKI, N. P., HORN, I., MCGOWAN, T. W.; MCGOWAN, C. M. The prevalence of endocrinopathic laminitis among horses presented for laminitis at a first-opinion/referral equine hospital. *Domestic. Animal Endoc.*, v. 41, p. 111-117, 2011.

KARIKOSKI, N. P.; MCGOWAN, C. M.; SINGER, E. R.; et al. Pathology of natural cases of equine endocrinopathic laminitis associated with hyperinsulinemia. *Vet. Pathol.*, v. 52, p. 945-956, 2015.

KASHYAP, S. R. e DEFRONZO, R. A. The insulin resistance syndrome: Physiological considerations. *Diab. Vasc. Disease Res.*, v.4, p.13–19, 2007.

KATZ, L. M.; BAILEY, S. R. A review of recent advances and current hypotheses on the pathogenesis of acute laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 44, p. 752-761, 2012.

KEEN, J. A.; HILLIER, C.; MCGORUM, B. C.; NALLY, J.E. Endothelin mediated contraction of equine laminar veins. *Equine Vet. J.*, v. 40, n. 50, p. 488-492, 2008.

KELLERER, M.; SESTI, G.; SEFFER, E.; et al. Altered pattern of insulin receptor isotypes in skeletal muscle membranes of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia.*, v. 36, p. 628-632, 1993.

KIENZLE, E.; SCHRAMME, S. Body condition scoring and prediction of bodyweight in adult warm-blooded horses. *Pferdeheilkunde.*, v. 20, p. 517– 524, 2004.

KIM, J.K.; MONTAGNANI, M.; KOH, K.K.;QUON, M. J. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation.* v. 113:, p. 1888–1904, 2006.

KÖNNER, A. C. e BRÜNING, J. C. Toll – like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends. Endocrinol. Metab.*, v. 22, p.16–23, 2011.

KREBS, D. L.; HILTON, D. J. A new role for SOCS in insulin action: suppressor of cytokine signaling. *Sci. Signaling.* v. 2003, n. 169, p. pe6, 2003

KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, J. E. Fisiopatologia da Hipertensão. *Ver. Soc. Card. Estado S. P.* v. 9, n. 1, p. 1 – 7. 1999.

KRONFELD, D. S.; TREIBER, K. H.; HESS, T. M.; BOSTON, R. C. Insulin resistance in the horse: Definition, detection, and dietetics. *J. Animal Sci.*, v. 83, p. E22 – E31, 2005a.

KRONFELD, D.S.; TREIBER, K. H.; GEOR, R. J. Comparison of nonspecific indications and quantitative methods for the assessment of insulin resistance in horses and ponies. *J. Ame. Vet. Med. Ass.*, v. 226, p. 712-719, 2005b.

KRONFELD, D.S.; TREIBER, K.H.; HESS, T.M.; SPLAN, R.K.; BYRD, B.M.; STANIAR, W.B.; et al. Metabolic syndrome in healthy ponies facilitates nutritional countermeasures against pasture laminitis. *J. Nutr.*, v. 136, f. 7, p.2090S–2093S, 2006.

KRUSIC, L.; KRUSIC-KAPLJA, A.; CESTNIK, V. Insulin response after oral glucose application in growing Lipizzaner foals. In: Proceedings of the 15th Equine Nutrition and Physiology Symposium. Fort Worth, TX. Lexington (KY): ENPS 1997. p. 397–403.

KULLMANN, A.; WEBER, P. S.; BISHOP, J. B.; et al. Equine insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor expression in digital lamellar tissue and insulin target tissues. *Equine Vet. J.*, v. 48, p. 626 – 632, 2016.

KYAW-TANNER, M.; POLLITT, C.C. Equine laminitis: increased transcription of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) occurs during the developmental phase. *Equine Vet. J.*, v. 36, p. 221-225, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 2° ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros médicos, 1980. 839 p.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. 250p.

LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. Revisão do complexo do agronegócio do cavalo. Câmara de Equideocultura do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: Assessoria de Comunicação e eventos do MAPA, 2015.

LOFTUS, J. P.; et al. Leukocyte-derived and endogenous matrix metalloproteinases in the lamellae of horses with naturally acquired and experimentally induced laminitis. *Vet. immunology Immun.*, v. 129, n. 3, p. 221-230, 2009.

LONGLAND, A. C.; BYRD, B. M. Pasture nonstructural carbohydrates and equine laminitis. *J. Nut.*, v.136, p. 2099-2102, 2006.

LONGLAND, A. C. Starch, sugar and fructans: what are they and how important are they in diets for horses? In: HARRIS, P.A.; HILL, S.J.; ELLIOTT, J., et al, editors. The latest findings in laminitis research. The first WALTHAM-Royal. Veterinary College Laminitis Conference. Suffolk (UK): Equine Vet. J. Limited, p. 7–14, 2007.

LYON, C. J.; LAW, R.E.; HSUEH, W. A. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinol.*, v. 144, p. 2195-2200, 2003.

MACHADO, U.F.; SCHAAN, B.D.; SERAPHIM, P.M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v.50, n.2, p.117-189, 2006.

MAGALHÃES, J. F.; LIMA, I. R.; LIMA, L. R.; et al. Estudo da correlação de medidas radiográficas indicadoras de laminite em éguas da raça Mangalarga Marchador com e sem sinais de sobrepeso. *Arq. Brasileiro Médico Vet. Zootec.*, v. 66, f. 4, p. 1032-1032, 2014.

MANSO FILHO, H. C.; MANSO, H. E. C. C.; FERREIRA, L. M. C.; et al. Percentagem de gordura de cavalos criados em região tropical. *Acta Scient. Vet.*, v. 37, f. 3, p. 239 – 243, 2009.

MARSHALL, S.; GARVEY, W. T.; GELLER, M. Primary culture of isolated adipocytes. A new model to study insulin receptor regulation and insulin action. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 6376-6384. 1984.

- MASUZAKI, H.; PATERSON, J.; SHINYAMA, H.; et al. Atransgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*, v. 294, p. 2166-2170, 2001.
- MATHER, K.; LAAKSO, M.; EDELMAN, S.; et al. Evidence for physiological coupling of insulin-mediated glucose metabolism and limb blood flow. *Ame. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.*, v. 279, p. E1264-E1270, 2000.
- MATOS, A. F. G.; MOREIRA, R. O.; GUEDES, E. P. Aspectos neuroendócrinos da síndrome metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 47, p. 410-420, 2003.
- MATSUZAWA, Y. The role of fat topology in the risk of disease. *Int. J. Obes. (Lond)*, v. 32, f. 7, p. S83-92, 2008.
- MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 314, p. 1-16, 2010.
- McGOWAN, C. M.; NEIGER, R. Efficacy of trilostane for the treatment of equine Cushing's syndrome. *Equine Vet. J.*, v. 35, p. 414, 2003.
- McGOWAN, C. M.; FROST, R.; PFEIFFER, D. U.; et al. Serum insulin concentrations in horses with equine Cushing's syndrome: response to a cortisol inhibitor and prognostic value. *Equine Vet. J.*, v.36, p. 295-298, 2004.
- McGOWAN, C. M., ASPLIN, K., POLLITT, C., SILLENCE, M. Endocrinopathic Laminitis in Horses. *Equine Chapter Proceedings...* p. 12 - 15, 2007.
- McGOWAN, T. W.; HODGSON, D. R.; McGOWAN, C. M. The prevalence of equine Cushing's syndrome in aged horses. The prevalence of equine Cushing's syndrome in aged horses [abstract:113]. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 21, n. 3, p. 603, 2007.
- McGOWAN, C. M.; McGOWAN, T. W. Prevalence and risk factors for hyperinsulinemia in ponies [abstract]. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 22, n. 3, p. 734, 2008.
- McGOWAN, C. M. Endocrinopathic Laminitis. *Vet. Clin. Equine*. v. 26, p. 233-237, 2010.
- McKENZIE, H. C. Equine hyperlipidemias. *Vet. Clin. Equine*. v. 27, p. 59-72, 2011.
- MEHRING, J.S.; TYZNIK, W.J. Equine glucose tolerance. *J. Anim. Sci.*, v.30, p.764-766, 1970.
- MIGNATTI, P. e RIFKIN, D.B. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiology Review*, n. 73, p. 161-195, 1993.
- MILINOVICH, G.J.; KLIEVE, A.V.; POLLITT, C.C.; et al. Microbial events in the hindgut during carbohydrate-induced equine laminitis. *Vet. Clin. N. Ame. Equine Pract.*, v. 26, p.79-94, 2010.
- MILLER, M. A.; PARDO, I. D.; JACKSON, L. P.; et al. Correlation of pituitary histomorphometry with adrenocorticotrophic hormone response to domperidone administration

in the diagnosis of equine pituitary pars intermedia dysfunction. *Vet. Pathol.*, v. 45 p. 26–38, 2008.

MOORE, J. N., ALLEN, D., CLARK, S. Pathophysiology of acute laminitis. *Vet. Clinics N. Am.*, v.5, p.67-72, 1989.

MOORE, J. N.; BELKNAP, J. K. You say lamellae, I say laminae. Let's call...: an overview of the Havemeyer workshop on laminitis pathophysiology. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 129, n. 3, p. 149-150, 2009.

MORGAN, R.; KEEN, J.; MCGOWAN, C. Equine Metabolic Syndrome. *Vet. Record.*, v. 15, p. 173 – 179, 2015.

MOTTET, R. O. G. e HINEY, K. Revisiting the Henneke Body Condition Scoring System: 25 Years Later. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 29, n. 5, p. 417 – 418, 2009.

MUDALIAR, S.; HENRY, R.R. Effects of incretin hormones on beta-cell mass and function, body weight, and hepatic and myocardial function. *Ame. J. Med.*, v. 123, p. S19-S27, 2010.

MUNIYAPPA, R.; IANTORNO, M.; QUON, M. J. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Ame.*, v. 37, p. 685-711, 2008.

MUNIYAPPA, R.; MONTAGNANI, M.; KOH, K. K.; QUON, M. J. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr. Rev.* v. 28, p. 463-491, 2007.

MUOIO, D. M.; DOHM, G. L.; FIEDOREK, F. T. et al. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes*, v. 46, p.1360-1363, 1997.

NAYLOR, J. .M Hiperlipemia and hyperlipidemia in horses, ponies, and donkeys. *Compend. Conti. Educ. Pract. Vet.*, v. 4, p. 321 – 327, 1982.

NOSCHKA, E.; et al. Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. *Vet. Immunol. Immunopath.*, v. 129, n. 3, p. 242-253, 2009.

OBEL, N. Studies on the histopathology of acute laminitis. *Vet. Stockholm.*, p. 1-50, 1948.

OJEDA, J. L.; VENTOSA, J. A.; PIEDRA, S. The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection- SEM approach. *J. Anat.*, v. 199, p. 567-576, 2001.

OLSON, R. E. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.*, v. 128, n. 2, p. 439-443, 1998.

ONG, J.M.; SIMSOLO, R.B.; SAGHIZADEH, M.; et al. Effects of exercise training and feeding on lipoprotein lipase gene expression in adipose tissue, heart, and skeletal muscle of the rat. *Metabolism.*, v. 44, p. 1596-1605, 1995.

ORSINI, J. A.; CLARK, K.; INGLES, J.; et al. Clinical risk factors for equine laminitis: observational findings. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 840, 2013.

- PACKER, M.J.; HUNTER, G.L.; TRAYHURN, P., et al. Adipose tissue-derived adiponectin expression is significantly associated with increased post operative mortality in horse undergoing emergency abdominal surgery. *Equine vet. J.*, v. 43, n. 39, p. 26-33, 2010.
- PERONI, J. F.; MOORE, J. N.; NOSCHKA, E.; et al. Predisposition for venoconstriction in the equine lamellar dermis: implications in equine laminitis. *J. Appl. Physiol.*, v.100, p.759–763, 2006.
- POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 28, p. 38-46, 1996.
- POLLITT C.C.; DARADKA M. Equine laminitis basement membrane pathology: loss of type IV collagen, type VII collagen and laminin immunostaining. *Equine Vet. J.*, Supplement. v. 26, p. 139-144, 1998.
- POLLITT, C.C. Equine Laminitis, Rural Industries Research and Development Corporation, Australia., 2001, 99p.
- POLLITT, C. C. Equine Laminitis: current concepts. Queensland: Rural Industries Research and Development Corporation, Australia: 2008, 116p.
- POTENZA, M. A.; MARASCIULO, F. L.; CHIEPPA, D. M.; et al. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 289, p. H813–H822, 2005.
- PRATT, S.E.; R.J. GEOR; MCCUTCHEON, L. J. Repeatability of two methods for assessment of insulin sensitivity and glucose dynamics in horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 19, p. 883-888, 2005.
- RAJALA, M.W.; SCHERER, P.E. Minireview: the adipocyte—at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. v. 144, p. 3765–3773, 2003.
- RALSTON, S. L. Postprandial hyperglycemia/insulinemia in young horses with osteochondritis dissecans lesions. *J. Anim. Sci.*, v. 73, p. 184, 1995.
- RALSTON, S. L. Insulin and glucose regulation. *Vet. Clin. N. Ame. Equine Pract.*, v. 18, p. 295-304, 2002.
- RASOULI, N.; KERN, P.A. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J. Clin. Endocrin. Metabolism.*, v. 93, p. 564–573, 2008.
- REEVES, H. J.; LEES, R.; MCGOWAN, C. M. Measurement of basal serum insulin concentration in the diagnosis of Cushing's disease in ponies. *Vet. Rec.*, v. 149, p. 449–452, 2001.
- RHODES, C. Type 2 diabetes - A matter of b-cell life and death? *Science*, v. 307, 2005

- RIBEIRO, W.; VALBERG, S. J.; PAGAN, J. D.; et al. The effect of varying dietary starch and fat content on creatine kinase activity and substrate availability in equine polysaccharide storage myopathy. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 18, p. 887-894, 2004.
- RIZZONI, D.; PORTERI, E.; DE CIUCEIS, C.; et al. Hypertrophic remodeling of subcutaneous small resistance arteries in patients with Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 94, p. 5010-5018, 2009.
- ROBERTS, M. C.; HILL, F. W. G. The oral glucose tolerance test in the horse. *Equine Vet J.*, v. 5, p. 171-173, 1973.
- ROBERTSON, I. D. The association of exercise, diet and other factors with owner-perceived obesity in privately owned dogs from metropolitan PERTH, W. A. *Prev. Vet. Med.*, v. 58, n. 1-2, p. 75-83, 2003.
- ROBERTSON, T. P.; BAILEY, S. R.; PERONI, J. F. Equine laminitis: a journey to the dark side of venous. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 129, p. 164-166, 2009.
- ROSSDALE, D. D.; HOPES, R.; WINGFIELD, N. J.; OFFORD, K. Epidemiological study of wastage among race horses during 1982 and 1983. *Vet. Rec.*, v.116, p. 66-69, 1985.
- ROSSDALE, P. D. Cushing's syndromes, insulin resistance and endocrinopathic laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 36, n. 3, p. 194-198, 2004.
- RUGH, K. S.; GARNER, H. E.; SPROUSE, R. F.; HATFIELD, D. G. Left ventricular hypertrophy in chronically hypertensive ponies. *Lab. Anim Sci.*, v. 37, n. 3, p. 335-338, 1987.
- SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic.*, v. 4, p.711-716, 2003.
- SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D.J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 100, p. 7265-7270, 2003.
- SATO, H.; TAKINO, T.; OKADA, Y.; et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, v. 370, p. 61-65, 1994.
- SCHOTMAN, A. J. H. e KRONEMAN, J. Hyperlipaemia in ponies. *Neth. J. Vet. Sci.*, v. 2, p. 60 - 65, 1969.
- SCHOTT, H.C.; COURSEN ,C.L.; EBERHART, S.W.; et al. The Michigan Cushing's project. In: Proceedings of the 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. p. 22-24, 2001.
- SCHOTT, H. C. Pituitary pars intermedia dysfunction: Equine Cushing's disease. *Vet. Clin. N. Ame. Equine Pract.*, v. 18,p. 237- 270, 2002.
- SHANIK, M. H.; XU, Y.; SKRHA, J.; et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care.*, v. 31, Suppl. 2, p. S262-S268, 2008.

SHEPHERD, P. R.; KAHN, B. B. Glucose transporters and insulin action: Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, v. 341, n. 4, p. 248-257, 1999.

SICK, E.; BREHIN, S.; ANDRÉ, P.; et al. Research paper: advanced glycation end products (AGEs) activate mast cells. *British J. Pharmacol.*, v. 161, p. 442-455, 2010.

SIMM, A.; CABELMANN, C.; SCHUBERT, A.; et al. Age associated changes of AGE-receptor expression: RAGE upregulation is associated with human heart dysfunction. *Experimental Gerontology*, v. 39, p. 407-413, 2004.

SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN, L. Advanced glycation endproducts: a review. *Diabetologia*, v. 44, p.129-146, 2001.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 88 (supl): S2-19

SOWERS, J.R.; FROHLICH, E.D. Insulin and insulin resistance: Impact on blood pressure and cardiovascular disease. *Med. Clin. N. Ame.*, v. 88, p. 63-82, 2004

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A.; et al. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Br. Cardiol.*, v. 88, Supl. I, p. 4, 2007.

STASHAK, T. S. Horseowner's Guide to Lameness. 1st ed. CANN, C. C.; HUNSBERGER, S.; CARLEY, P. J.; MAGEE, R. D. Philadelphia, USA: Lea and Febiger, 1996. 85-120p.

STICKER, L. S.; THOMPSON, D. L.; SMITH, L.A.; et al. Pituitary hormone and insulin responses to infusion of amino acids and N-methyl-D, L-aspartate (NMA) in horses. Proceeding of the 16th Equine Nutrition and Physiology Symposium. Raleigh, NC. Lexington (KY): ENPS. p. 90-91, 1999.

STOKES, A.M. In vitro responses of palmar digital vessel rings from horses with naturally-acquired laminitis to endothelin-1. 2003. 303 f. Tese (Doutorado) - Baton Rouge: Louisiana State University, School of Veterinary Medicine.

SUAGEE, J. K.; CORL, B. A.; CRISMAN, M. V.; et al. Effects of acute hyperinsulinemia on inflammatory proteins in horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 142, p. 141-146, 2011.

SUMMERS, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progr. Lipid Res.*, v. 45, p. 42-72, 2006.

SUTHERLAND, J. P.; MCKINLEY, B.; ECKEL, R. H. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, v. 2, p. 82-104, 2004.

TADROS, E. M.; FRANK, N. Endocrine disorders and laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 25, iss. 3, p. 152 - 162, 2013.

THATCHER, C. D.; PLEASANT, R. S.; GEOR, R. J.; ELVINGER, F. Prevalence of overconditioning in mature horses in southwest Virginia during the summer. *J. Vet. Int. Med.*, v. 26, p. 1413-1418, 2012.

TILEY, H. A.; GEOR, R. J.; MCCUTCHEON, L. J. Effects of dexamethasone administration on insulin resistance and components of insulin signaling and glucose metabolism in equine skeletal muscle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 69, f. 1, p.51–58, 2008.

TOTH, F.; FRANK, N.; MARTIN-JIMENEZ, T.; et al. Measurement of C-peptide concentrations and responses to somatostatin, glucose infusion, and insulin resistance in horses. *Equine Vet. J.*, v. 42, p. 149-155, 2010.

TRAYHURN, P., WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Bra. J. Nutr.*, v. 92, p. 347–355, 2004.

TREIBER, K.H.; KRONFELD, D. S.; HESS, T. M.; et al. Use of proxies and reference quintiles obtained from minimal model analysis for determination of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell responsiveness in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 2114-2121, 2005.

TREIBER, K.H.; KRONFELD, D.S.; GEOR, R.J. Insulin resistance in equids; possible role in laminitis. *J. Nutr.*, v. 136, p. 2094S–2098S, 2006.

UEMURA, S.; MATSUSHITA, H.; LI, W.; et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: Role of oxidative stress. *Circ. Res.*, v. 88, p. 1291-1298, 2001.

VALBERG, S.; FIRSHMAN, A. N. N. A. Insulin Resistance–What Is It and How Do We Measure It?. *Advances in Equine Nutr. IV*, p. 355, 2009.

VALGIMIGLI, M.; MERLI, E.; MALAGUTTI, P.; et al. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.420, p. 255-261, 2003.

VASQUES, A. C. J.; ROSADO, L. E. F. P. D. L.; ROSADO, G. P.; et al. (2009). Habilidade de indicadores antropométricos e de composição corporal em identificar a resistência à insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*.

VENUGOPAL, C. S.; EADES, S.; HOLMES, E. P.; BEADLE, R. E. Insulin resistance in equine digital vessel rings: an in vitro model to study vascular dysfunction in equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 43, p. 744– 749, 2011.

VICK, M. M.; SESSIONS, D. R.; MURPHY, B.A.; et al. Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 18, p. 609–617, 2006.

VICK, M. M.; ADAMS, A. A.; MURPHY, B. A.; et al. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *J. An. Sci.*, v. 85, n. 5, p. 1144–55, 2007.

VICK, M. M.; MURPHY, B. A.; SESSIONS, D. R.; et al. Effects of systemic inflammation on insulin sensitivity in horses and inflammatory cytokine expression in adipose tissue. *Am. J. Vet. Res.*, v. 6, n. 1, p. 130–139, 2008.

WAITT, L. H.; CEBRA, C. K. Characterization of hypertriglyceridemia and response to treatment with insulin in horses, ponies, and donkeys: 44 cases (1995-2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 234, n. 7, p. 915–919, 2009.

WALLER, A. P.; BURNS, T. A.; MUDGE, M. C.; et al. Insulin resistance selectively alters cell-surface glucose transporters but not their total protein expression in equine skeletal muscle. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 25, p. 315-321, 2011.

WALLETT, L. A. Laminitic paleopathology: evidence from the fossil record of Equus. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 840, 2013.

WALSH, D. M.; MCGOWAN, C. M.; MCGOWAN, T.; et al. Correlation of Plasma Insulin Concentration with Laminitis Score in a Field Study of Equine Cushing's Disease and Equine Metabolic Syndrome. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 29, n. 2, p. 87-94, 2009.

WATSON, T. D.; BURNS, L.; LOVE, S.; et al. Plasma lipids, lipoproteins and post-heparin lipases in ponies with hyperlipaemia. *Equine Vet. J.*, v. 24, p. 341–346, 1992.

WATSON, T. D.; BURNS, L.; FREEMAN, D. J.; et al. High density lipoprotein metabolism in the horse (Equus caballus). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, v. 104, p. 45–53, 1993.

WEBER, P. S. D.; SCHERMERHORN, K. N.; McCUTCHEON, L. J.; et al. Adipokine, chemokine, and cytokine expression profiles in adipose tissue depots of lean and overweight ponies. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 838 – 859, 2013.

WEINSTEIN, S. P.; PAQUIN, T.; PRITSKER, A.; HABER, R. S. Glucocorticoid-induced insulin resistance: dexametasone inhibits the activation of glucose transport in rat skeletal muscle by both insulin- and non insulin-related stimuli. *Diabetes*, v. 44, p. 441 - 445, 1995.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clinical Invest.*, v. 112, p. 1796–1808, 2003.

WESS, D. J.; TRENT, A. M.; JOHNSTON, G. Prothrombotic events in the prodromal stages of acute laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 56, n. 8, p. 986-991, 1995.

WESTERVELT, R. G.; STOUFFER, J. R.; HINTZ, H. F.; SCHRYVER, H. F. Estimating fatness in horses and ponies. *J. ANIM. SCI.*, v. 43, p. 781-785, 1976.

WILD, S. H.; BYRNE, C. D. ABC of obesity: risk factors for diabetes and coronary heart disease. *Br. Med. J.*, v. 333, p. 1009–1011, 2006.

WYLIE, C. E.; COLLINS, S. N.; VERHEYEN, K. L. P.; NEWTON, R. Epidemiological aspects of equine laminitis in Great Britain: 2009-2011. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 839 – 840, 2013.

WYSE, C. A.; MCNI, E. K. A.; TANN AHILL, V. J.; et al. Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. *Vet. Rec.*, v. 162, p. 590-591, 2008.

XAVIER, H. T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J. R.; et al. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 101, n. 4, p. 1-20, 2013.

XAVIER, V. F.; LIMA, I. R.; MARVAL, C. A. D.; et al. Estudo radiográfico do posicionamento da falange distal e sua correlação com obesidade em equinos de patrulhamento da Polícia Militar do estado de Minas Gerais. *Ass. Br. Med. Vet. Zoot.*, v. 66, n. 3, p. 672 – 680, 2014.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, v.112, p. 1821–1830, 2003.

YAMAGISHI, S. Advanced glycation end products and receptor-oxidative stress system in diabetic vascular complications. *Ther. Apher. Dial.*, v. 13, p. 534-539, 2009.

YUAN, S. Y.; BRESLIN, J. W.; PERRIN, R.; et al. Microvascular permeability in diabetes and insulin resistance. *Microcirculation*, v. 14, p. 363-373, 2007.

ZECCHINS, H. G.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Mecanismos Moleculares de Resistência à insulina na Síndrome Metabólica. *Ver. Soc. Cardiol. Estado SP*, v. 14, n. 4, p. 574 – 589, 2004.

ZHANG, D. et al. Sensilla on the antennal funiculus of the horse stomach bot fly, *Gasterophilus nigricornis*. *Medical and Vet. Entomology*, v. 26, n. 3, p. 314-322, 2012.

CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES DOS BIOMARCADORES E CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE EQUINOS COM OBESIDADE INDUZIDA

RESUMO

A resistência à insulina (RI) é o ponto central dos mecanismos fisiopatológicos da síndrome metabólica equina (SME), a grande maioria dos cavalos e pôneis afetados apresentam o quadro de obesidade generalizada e/ou regional. As técnicas para diagnosticar a SME se caracterizam pelo seu alto custo e complexidade, dificultando o seu uso na rotina do clínico. A identificação de métodos mais acessíveis para serem utilizados na prática clínica é imprescindível para possibilitar intervenções precoces e uma melhor avaliação e acompanhamento dos animais com essa afecção. O objetivo foi caracterizar a deposição de gordura regional, as alterações no perfil hormonal e metabólico de equinos submetidos à dieta hipercalórica, com a finalidade de verificar e conhecer melhor o desenvolvimento da síndrome metabólica equina e tentar encontrar ferramentas que possibilitem a realização de seu diagnóstico precoce. Foram utilizados 9 equinos adultos com escore corporal (ECC) médio (\pm DP) inicial de $2,9\pm 1$, os animais foram submetidos a uma indução da obesidade por um período de 150 dias, atingido um ECC final de $8,3\pm 1$. As amostras sanguíneas foram coletadas através de punção da jugular para a mensuração dos valores plasmáticos de HDL-c, LDL-c, VLDL-c, ácidos graxos não esterificados (AGNE), frutamina, glicose, colesterol total, triglicérides e insulina. A condição corporal foi mensurada pela observação do peso dos animais, do escore corporal, do acúmulo do tecido adiposo na região da crista do pescoço e, com o uso de fita métrica, foi aferida a circunferência do pescoço em três pontos pré-definidos com 25, 50 e 75% em relação à medida do comprimento. O acúmulo de gordura na base da cauda foi aferido por uso de ultrassonografia e foi mensurada a pressão arterial média. Os dados foram coletados antes do início do experimento com o intervalo de 15 dias até o final do experimento. Foi mensurado os proxies G:I, RISQI, HOMA-IR e o MIRG. Foi realizado o teste de baixa dose de glicose oral (TBDGO). Os resultados foram submetidos a análise de variância considerando-se os efeitos de tempo e as médias comparadas com medidas repetidas pelo teste de Tukey para os dados paramétrico e pelo teste Friedman para os dados não paramétricos, com o valor $P\leq 0,05$. A dieta hipercalórica promoveu um aumento de peso e da deposição de gordura regional, provocando importante impacto no metabolismo dos equinos estudados com aumento nas concentrações sanguíneas de colesterol total, LDL-c e HDL-c. A RI ficou evidente pelo aumento dos níveis plasmáticos basais e pelas alterações em diversos proxies. Contudo, ficou evidente uma compensação pela resposta secretória insulínica das células β do pâncreas, que se manifestou pelo aumento dos níveis plasmáticos de insulina pós jejum ou exposição à glicose gástrica com concomitante redução nos níveis de glicose e frutamina pós-jejum e pela redução da área sob a curva de glicemia no teste dinâmico. Tais achados comprovam a ocorrência de hiperinsulinemia associada à resistência insulínica e hipercolesterolemia em equinos expostos a dietas à dieta hipercalórica.

Palavras Chave: Diagnóstico, Metabolismo, resistência à insulina, Síndrome metabólica equina.

ABSTRACT

Insulin resistance (IR) is the focal point of the pathophysiological mechanisms of the equine metabolic syndrome (EMS), the vast majority of horses and ponies affected present generalized and / or regional obesity. The techniques for diagnosing EMS are characterized by their high cost and complexity, making it difficult to use them in the clinical routine. The identification of more accessible methods to be used in clinical practice is essential to enable early interventions and better evaluation and monitoring of animals with this condition. The objective of this experiment was to characterize regional fat deposition, changes in the hormonal and metabolic profile of horses submitted to the hypercaloric diet, in order to verify and better understand the development of the equine metabolic syndrome and to try to find tools that allow the realization of its early diagnosis. A total of 9 adult horses with a mean body score (\pm SD) of 2.9 ± 1 were used, the animals were submitted to obesity induction for a period of 150 days, reaching a final ECC of 8.3 ± 1 . Blood samples were collected by jugular puncture to measure the plasma values of HDL-c, LDL-c, VLDL-c, non-esterified fatty acids (NEFA), fructosamine, glucose, total cholesterol, triglycerides and insulin. The body condition was measured by observing the weight of the animals, the body score, through the accumulation of the adipose tissue in the region of the crest of the neck and with the use of tape measure was measured the circumference of the neck in three predefined points with 25, 50 and 75% relative to the length measurement. The accumulation of fat at the base of the tail was measured using ultrasonography and the mean arterial pressure was measured. The data were collected before the start of the experiment with the interval of 15 days until the end of the experiment. The G: 1, RISQI, HOMA-IR and MIRG proxies were measured. The low dose oral glucose test (TBDGO) was performed. The results were submitted to analysis of variance considering the effects of time and means compared with repeated measures by the Tukey test for the parametric data and by the Friedman test for non-parametric data, with a significant P value ≤ 0.05 . The hypercaloric diet promoted weight gain and regional fat deposition, causing a significant impact on the metabolism of the studied equines with increase in blood concentrations of total cholesterol, LDL-c and HDL-c. RI was evidenced by increased basal plasma levels and changes in various proxies. However, compensation for the insulin secretory response of pancreatic β cells was evident, which was manifested by an increase in plasma levels of post-fasting insulin or exposure to gastric glucose with a concomitant reduction in post-fasting glucose and fructosamine levels and by reduction of the area Under the glycemia curve in the dynamic test. These findings confirm the occurrence of hyperinsulinemia associated with insulin resistance and hypercholesterolemia in horses exposed to diets in the hypercaloric diet.

Keywords: *Diagnosis, Metabolism, Equine metabolic syndrome, resistance insulin.*

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome Metabólica Equina (SME) não é uma doença propriamente dita, é um conjunto de anormalidades clínicas identificadas coletivamente em um único paciente, com uma probabilidade maior de desenvolver laminite (Johnson, 2002). O equino é considerado com SME quando apresenta características fenotípicas como obesidade, desregulação insulínica (DI) e predisposição ao desenvolvimento de laminite (Frank et al., 2010).

Outras características têm sido associadas com a SME, como a supra regulação de indicadores inflamatórios, propensão de desenvolver hipertensão arterial, infertilidade, hipertrigliceridemia e hiperleptinemia (Vick et al., 2007, Vick et al, 2008, Bailey et al., 2008, Carter et al., 2009, Rugh et al., 1987, Frank et al., 2010).

Mesmo com o aumento dos estudos sobre a SME, ainda há poucos relatos epidemiológicos sobre sua prevalência. Estima-se que até 40% dos equinos domésticos sejam obesos, enquanto que a hiperinsulinemia pode ser observada entre 22 a 29% da população de equinos suscetíveis. Já a prevalência de equinos com SME com laminite pode variar entre 1,5 a 34% (Morgan e McGowan, 2015, Wyse et al., 2008, Thatcher et al., 2012, Morgan et al., 2014, Wylie et al., 2011).

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a obesidade em um cavalo é através da avaliação do escore de condição corporal (ECC), desenvolvido por Henneke e colaboradores (1983). Esse método utiliza a análise da deposição da gordura na região subcutânea por meio da observação visual e palpação. Sua pontuação segue uma escala de 9 pontos. Mas esse sistema é subjetivo e pequenas nuances na medição do ECC podem não ser detectados, mesmo por profissionais treinados (Geor, 2008). Para contornar essa deficiência existem outras ferramentas para avaliar o acúmulo de adiposidade localizada, dentre elas, a mensuração da deposição de gordura na crista do pescoço (ECP), a mensuração da circunferência do pescoço (MCP) e a aferição da espessura do tecido adiposo localizado na base da cauda por meio de exame ultrassonográfico. Esses padrões de determinação de acúmulo de gordura já foram verificados como eficazes em estudos que examinaram carcaças necropsiadas (Kane et al., 1989, Westervelt et al., 1976).

Correlações positivas entre hiperinsulinemia com escore corporal e com a medição da crista do pescoço foram demonstradas em 10 % de uma população de equinos selecionados aleatoriamente em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos da América. Em outro estudo realizado na Austrália, 28% de equinos de várias raças de pôneis apresentavam hiperinsulinemia (Geor et al., 2007, McGowan, 2008).

Os fatores que interferem na eficiência da insulina nas células alvo são os GCs, os ácidos graxos livres e as adipocinas. Quando a capacidade da insulina em facilitar a remoção da glicose circulante é prejudicada, a concentração da glicose no plasma tende a se elevar, causando a estimulação contínua das ilhotas pancreáticas. Isso promove hiperinsulinemia, causando um ciclo vicioso. A resistência insulínica (RI) em equinos se caracteriza com uma elevada concentração de insulina e um aumento moderado de glicose plasmático (Fonseca et al., 2004).

O diagnóstico para a sensibilidade à insulina é realizado através de testes dinâmicos. Como a insulina e a glicose tem seu comportamento modificado é recomendado mensurar com precisão ambos os metabólitos. É necessário a determinação exata dos intervalos normais para cada teste de diagnóstico, uma vez que vários fatores podem interferir nos resultados, como a idade, raça, condicionamento físico e tipos de dieta (Valberg e Firshman, 2009).

Os testes dinâmicos demonstram a situação completa dos valores de insulina e glicose. Embora um teste ideal ainda não foi determinado, os testes dinâmicos são os mais sensíveis para determinar quadros de RI se comparados aos valores basais (Frank et al., 2010).

As técnicas para diagnosticar a SME se caracterizam pelo seu alto custo e por sua complexidade, dificultando o seu uso na rotina do clínico, a identificação de métodos mais acessíveis para serem utilizados na prática clínica é imprescindível para possibilitar intervenções precoces e uma melhor avaliação e acompanhamento dos animais com essa afecção (Vasques et al., 2009).

Os biomarcadores são uma alternativa, eles são definidos como fatores que são mensurados de maneira objetiva, tendo como finalidade definir processos fisiológicos ou patológicos para uma intervenção terapêutica eficiente. Podem ser utilizados para o diagnóstico de várias doenças, dependendo de qual finalidade, são classificados como de suscetibilidade, de exposição e de efeito. Servindo como uma ferramenta para a identificação de uma doença ou de uma condição adversa com certa antecedência (Amorim, 2003, Galantino-Homer et al., 2013).

Os potenciais biomarcadores a serem utilizados para a identificação da SME são: as células de dano tecidual inespecífico, estresse celular, resposta inflamatória, de resposta de lesão de tecido específico, hipertensão, lipoproteínas e a própria RI. Apesar de que marcadores inespecíficos possam estar alterados em decorrência de outras alterações, é possível definir um padrão específico da expressão desses biosinalizadores e desenvolver ensaios múltiplos para a sua detecção simultânea (Galantino-Homer et al., 2013, Treiber et al., 2006, Carter et al., 2009).

O objetivo deste experimento foi caracterizar a deposição de gordura regional e as alterações no perfil hormonal e metabólico de equinos mestiços da raça Mangalarga Marchador submetidos à dieta hipercalórica, com a finalidade de verificar e conhecer melhor o desenvolvimento da síndrome metabólica equina em equinos e tentar determinar ferramentas que possibilitem o seu diagnóstico precoce.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com o número de protocolo 49/2014. O financiamento foi aprovado pelo edital da chamada universal N° 14/2013 da CNPQ, faixa B, até R\$ 60.000,00, com o número de protocolo de 477488/2013-7.

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados 9 equinos, hígidos, 5 fêmeas não gestantes e 4 machos castrados mestiços da raça Mangalarga Marchador, com idade média (\pm DP) de 48 (\pm 5) meses. O peso médio inicial foi de 316 ± 62.68 kg e escore de condição corporal (ECC) médio de $2,9 \pm 1$. Inicialmente, os animais foram aplicados endectocida (Eqvalan® pasta, 200mcg/kg, VO), e imunizados contra tétano. Para padronização da dieta, os equinos foram alojados em baias individuais devidamente identificadas e forradas com serragem. O experimento foi realizado nas instalações da Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo, Centro de Produção Sustentável (CPS), situada na cidade de Pedro Leopoldo no estado de Minas Gerais.

Os animais foram submetidos a avaliação clínica, pesagem e numeração (1 a 10). Para excluir a possibilidade de disfunção da glândula pituitária “pars intermedia” (DPPI) foi realizado o teste de supressão por dexametasona, seguindo o protocolo de Donaldson et al. (2004). Para tanto, foi administrada dexametasona na dose de 40 µg/Kg de peso corporal por via intramuscular. Amostras de sangue foram coletadas por punção da jugular em tubos de coleta sem anticoagulante, imediatamente antes e após 19 horas da administração, para a mensuração da concentração do cortisol plasmático. Os resultados dos testes de supressão por dexametasona foram negativos para todos os animais, descartando assim DPPI.

Os animais não participaram de atividades físicas durante o experimento, sendo soltos em piquetes coletivos por período de uma hora diariamente.

2.2. DIETA PARA INDUÇÃO DE OBESIDADE

Durante o período experimental a água e sal mineralizado (Coequi Plus®, Tortuga) foram oferecidos “ad libitum”. Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de adaptação de duas semanas em que foi fornecido uma dieta composta apenas de feno de gramínea *Cynodon dactylon* (L.) Pers.Var. “Coast cross”, sendo fornecido 2% do peso corporal.

A obesidade foi induzida pelo fornecimento de energia digestível (ED) em quantidades de 100% superiores à exigência de manutenção estabelecida pela literatura de referência (Equine Nutrient Requirements, NRC 2007). O cálculo da ED de manutenção (EDm) foi feito com base na fórmula matemática $ED = 1,4 + (0,03 \times \text{Kg de peso vivo [p.v.]})$, demonstrada pelo NRC (2007).

Com o intuito de evitar transtornos gastrointestinais, estabeleceu-se previamente que os animais receberiam uma vez a EDm na forma de concentrado e uma vez a EDm em forma de forragem. Para tanto utilizaram-se os valores disponíveis para energia digestível dos alimentos disponibilizados: concentrado comercial (Guabi Equitage Laminados®) (ED: 3,650 Mcal/kg) e feno de gramínea *Cynodon dactylon* (L.) Pers.Var. “Coast cross” (ED: 2,0 Mcal/kg).

Desta forma, as quantidades de feno e de ração foram calculadas considerando-se a EDm de cada animal dividida pela concentração de energia digestível de cada tipo de alimento:

$$\text{Quantidade de Concentrado (Kg): } ED = (1,4 + (0,03 \times \text{Kg de p.v.})) / 3,650$$

$$\text{Quantidade de Volumoso (Kg): } ED = (1,4 + (0,03 \times \text{Kg de p.v.})) / 2$$

Este cálculo foi repetido a cada quinze dias, após a mensuração do peso dos animais, mantendo assim a proporção de 100% sobre à exigência de ED estabelecida pelo NRC (2007) constante durante os 150 dias do período experimental.

Tabela 2: Composição bromatológica do concentrado (Guabi Equitage Laminados®), e do feno (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.Var. “Coast cross”) e seus respectivos ingredientes utilizados durante o período experimental.

	Concentrado	Feno
Energia		
ED (Mcal/kg)	3,650	2,0
Nutrientes (%)		
MS	87	89,4
MM	10	5,48
PB	12	17
FDN	10	56,8
Amido	27	1,5
EE	9	1,43
Ca	1,6	0,48
P	0,5	0,35
Ingredientes Energéticos (%)		
Milho	19	-
Aveia	12	-
Óleo	5	-

MS: Matéria Seca, MM: Matéria mineral, PB: Proteína bruta, FDN: Fibra em detergente Neutro, EE: Estrato etéreo, Ca: Cálcio, P: Fósforo. Dados fornecidos pelos fornecedores.

A dieta foi disposta em cochos separados, repartido em 3 (três) refeições diárias, em partes iguais e oferecidas nos horários das 6:00, 12:00 e 18:00 horas do dia. Com a finalidade de prevenir alterações clínicas nos cavalos o concentrado comercial foi fornecido de maneira gradativa até chegar ao valor estipulado pela fórmula de determinação da quantidade de concentrado, a metodologia empregada para o fornecimento inicial foi, no primeiro dia foi fornecido 750 g do concentrado comercial distribuídos nos três horários pré determinados, e a partir deste momento, nos dias seguintes foi adicionado 750 g do concentrado comercial em todos os três horários até chegar ao volume determinado pela fórmula. Essa dieta foi provisionada aos animais durante um período de 150 dias.

2.3.AVALIAÇÃO CLÍNICA

O exame para detecção de claudicação e o exame de sensibilidade à pinça de casco foram realizados antes do início da indução da obesidade e a cada 30 dias, até o final do experimento.

Para a análise do grau de claudicação os animais foram avaliados por três examinadores diferentes de maneira individual e independente. Os exames foram registrados em vídeo e ocorreram em superfície dura e plana, nos andamentos de passo e trote em linha reta e em uma sequência padrão. A claudicação foi graduada de acordo com a escala de 0 a 5 padronizada pela American Association of Equine Practitioners (AAEP, 1996), demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Método de classificação de claudicação em equinos da American Association of Equine Practitioners (AAEP, 1996).

Grau	Descrição de Claudicação
0	A claudicação não é perceptível em nenhuma circunstância;
1	Intermitente e de difícil observação, independente das circunstâncias;
2	Difícil de se observar ao passo ou trote em linha reta; aparente sobre certas circunstâncias (carregando peso, em círculos, declives, superfícies duras);
3	Claudicação é consistente e observável em circunstâncias ao trote;
4	Claudicação óbvia: balança a cabeça, tira o membro subitamente do apoio, passo encurtado;
5	Suporte de peso mínimo no membro afetado, em movimento ou em repouso; incapacidade de se mover.

Fonte: Modificado de Baxter e Stashak (2011)

Nos mesmos intervalos, a pinça de casco foi utilizada com compressão de forma padronizada em toda a área do casco, afim de determinar o grau de sensibilidade dolorosa. A sensibilidade foi graduada seguindo a seguinte escala: 0) sem resposta frente a compressão moderada; 1) resposta de baixa intensidade frente a pressão moderada 2) resposta evidente frente a pressão moderada e 3) resposta evidente frente a pressão de baixa intensidade.

2.4.DETERMINAÇÃO DO ESCORE CORPORAL (ECC) E MENSURAÇÃO DE VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS DA DEPOSIÇÃO DE GORDURA REGIONAL

Antes do início do fornecimento da indução da obesidade e quinzenalmente até o final do experimento, foram determinados o escore de condição corporal (ECC), o escore da crista do pescoço (ECP), o peso dos animais (P) e as medidas da circunferência do pescoço (MCP).

As medidas de espessura do tecido adiposo localizado na base da cauda por meio de exame ultrassonográfico (UBC) foram mensuradas antes do início do experimento e com o intervalo de 30 dias até o final do experimento.

Para a avaliação do escore de condição corporal foi utilizado a escala que varia de 1 a 9 (1 = animal emaciado e 9 = animal extremamente obeso) de acordo com graduação proposta por Henneke et al. (1983), demonstrado na Tabela 1.

Para verificação do grau de depósito de gordura na crista do pescoço (ECP), um sinal de doença metabólica, foi utilizado uma escala de 0 a 5 (0 = crista não visível e nem palpável e 5 = crista aumentada e pendida para um dos lados), de acordo com descrito Carter et al. (2009) e apresentado na Figura 2.

Para avaliação do peso dos animais foi utilizado uma balança de pesagem. Para avaliação objetiva da deposição local de gordura, medidas da circunferência do pescoço (MCP), foram aferidas em três alturas diferentes em relação ao comprimento total do pescoço, segundo metodologia descrita

por Frank et al. (2006). Essas medidas foram realizadas em pontos dorsais correspondendo a 25%, 50% e 75% deste comprimento (Figura 3).

As medidas de UBC foram realizadas por meio de um aparelho de ultrassom (Echovet®, modelo KX 5100), munido de um transdutor de 5 MHz, que foi posicionado do lado direito da base da cauda, a 5 cm de distância da linha mediana (Figura 4), segundo metodologia descrita por Gentry et al. (2004).

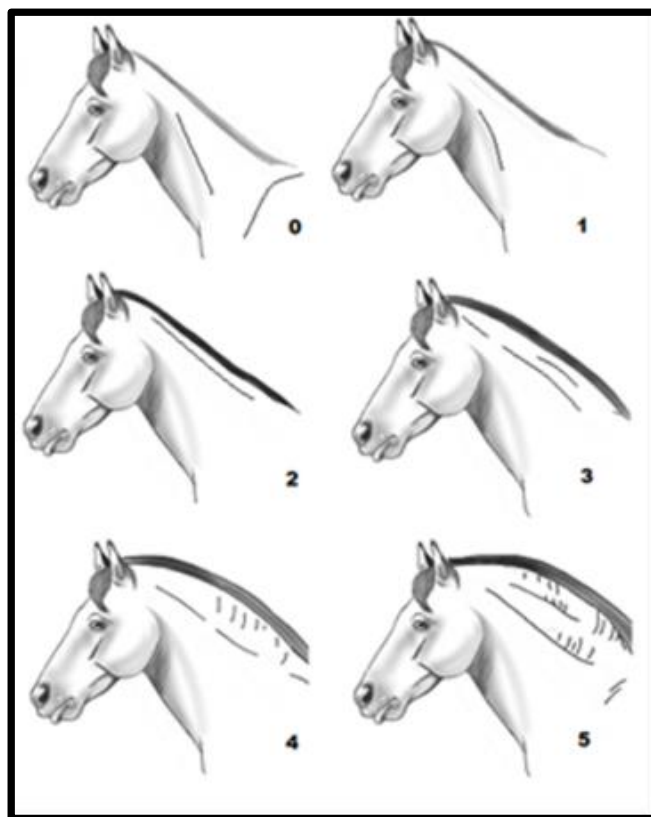


Figura 2: Ilustração dos escores de deposição de gordura na crista do pescoço (ECP). Adaptado de Frank et al 2006.

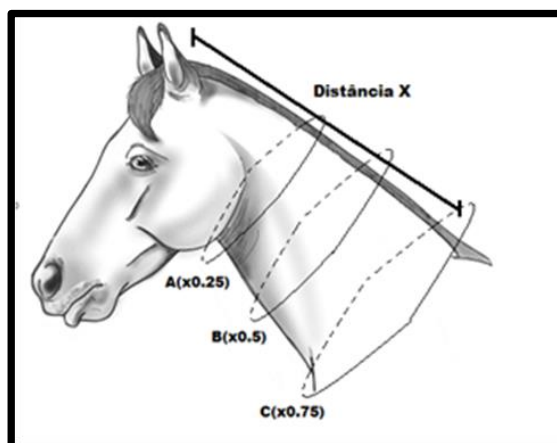


Figura 3: Ilustração do procedimento usado na mensuração do escore da circunferência do pescoço (ECP), considerando três pontos iniciais: 25% (A), 50% (B) e 75% (C) da distância do topo da cabeça até o topo da cernelha (Distância X). Adaptado Frank et al., 2006.

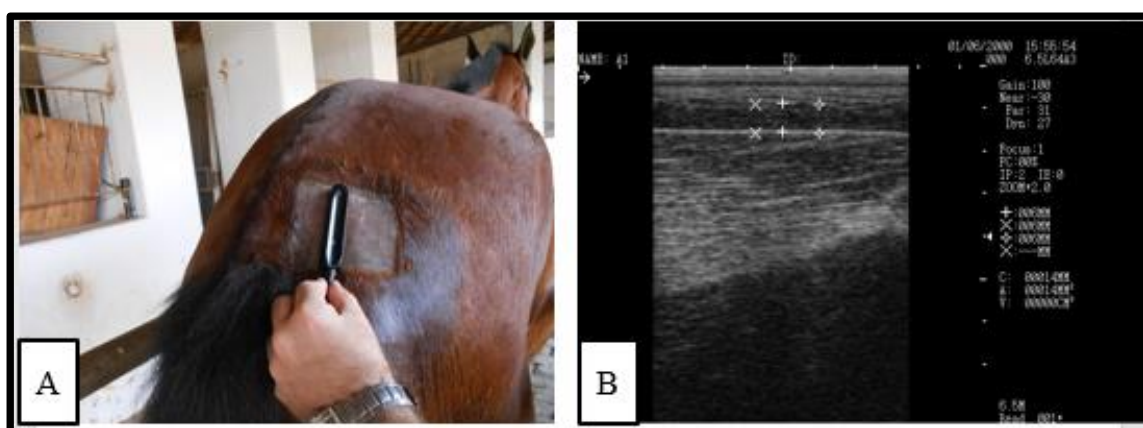


Figura 4: Ilustração do procedimento utilizado para a mensuração da deposição de gordura na base da cauda por meio de exame ultrassonográfico da base da cauda (UBC). **A**: demonstração da localização do transdutor do aparelho de ultrassonografia. **B**: demonstração da imagem obtida do aparelho de ultrassom com a mensuração de 3 pontos da camada de gordura subcutânea.

2.5. COLETA DO MATERIAL

As amostras foram colhidas através de venopunção da jugular externa esquerda com o uso de um sistema de coleta a vácuo (vacutainer) e acondicionados em frascos sem anticoagulantes, com EDTA ou com heparina sódica, sendo imediatamente centrifugadas e armazenadas em temperaturas de -18°C .

As coletas ocorreram com intervalos de 15 dias, entre as 7:00 e 9:00 horas, com a primeira coleta antes do início do protocolo de indução do ganho de peso sendo denominada de basal e durante todo o período experimental sendo classificadas como tempos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150. As coletas foram realizadas com os animais em 12 horas de jejum alimentar prévio.

2.6. ANÁLISES DOS BIOMARCADORES

Para as análises dos triglicérides (TRI), colesterol (COL), HDL-c, LDL-c, frutamina (FRUT) e dos ácidos graxos não esterificados (AGNE), as amostras de sangue utilizadas estavam acondicionadas nos frascos de tubo seco, para a análise de glicose (GLI) foram utilizadas as amostras acondicionadas nos tubos com heparina sódica, utilizando as amostras coletadas antes do início do fornecimento da dieta e a cada 15 dias até o fim do experimento.

Para a análise de insulina e VLDL-c foram utilizadas as amostras acondicionadas em tubo seco e coletadas antes do início do experimento, e com intervalo de 30 dias entre as coletas até o fim do experimento.

Os ensaios foram realizados pelo sistema de identificação espectrofotométrica em analisador bioquímico automatizado (COBAS MIRAGE-ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEM[®]) com a utilização de Kits comerciais específicos (Labtest[®]), para determinação plasmática de glicose utilizando a metodologia GOD-Trinder (ref. 133), frutamina seguindo a técnica colorimétrica (Redução do NBT - azul de nitrotetrazóico, ref. 97), as diferentes frações do colesterol e para avaliação da concentração total de lipídios foi aplicado o método de Lowry (1977), para o colesterol total foi analisado através do método colorimétrico (Enzimático de Trinder, ref. 76), HDL-c foi utilizado o método colorimétrico (Precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, ref. 13), LDL-c analisado pela metodologia colorimétrica (Surfactante Seletivo, ref. 111), para a determinação dos triglicérides foi obtido através da metodologia colorimétrica (Reação de Trinder, ref. 87) e para a determinação do valor de VLDL-c foi realizado o cálculo pela equação de Friedewald et al. (1972).

Os ácidos graxos não esterificados foram determinados através da técnica de microfluorometria (Miles et al., 1983) utilizando o Kit comercial Randox NEFA[®] (Non-Esterified Fatty Acids) utilizando a metodologia colorimétrica (reagente liofilizado, ref. FA115) utilizando o sistema de identificação espectrofotométrica em analisador bioquímico automatizado (COBAS MIRAGE-ROCHE DIAGNOSTIC SYSTEM[®]). A insulina sérica foi determinada através da técnica de radioimunoensaio (Milipore's Porcine Insulin Radioimmunoassay), realizado em laboratório comercial.

Para a mensuração das pressões arteriais média foram realizadas três medições seguidas e depois foi calculada a média aritmética. A pressão arterial média foi mensurada pelo método oscilométrico utilizando monitor multiparamétrico (Handheld multiparameter monitor), onde o manguito foi colocado na base da cauda, sendo selecionado de acordo com a circunferência desta (Figura 5). A mensuração da pressão arterial foi realizada antes do início do experimento, e a cada 30 dias até o fim.

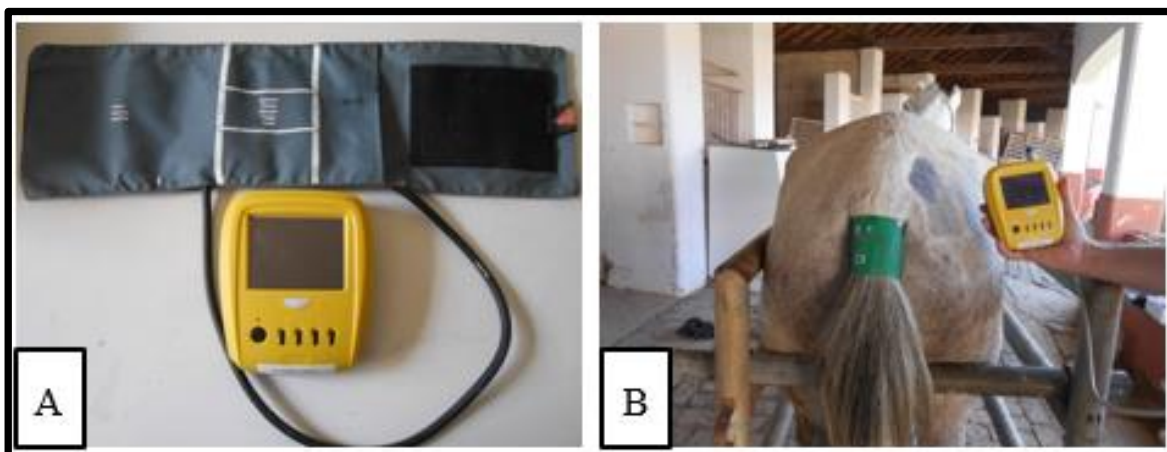


Figura 5: Ilustração do procedimento utilizado para a mensuração da pressão arterial média (PAM). A: demonstração do monitor multiparamétrico. B: demonstração da localização do manguito.

2.7.INDICADORES MATEMÁTICOS (PROXIES)

Os proxies utilizados neste experimento foram baseados nos valores basais de glicose e insulina, sendo eles a relação entre a glicose com a insulina (G:I), a sensibilidade à insulina (RISQI), a resposta secretória insulínica pelas células β do pâncreas (MIRGI) e o modelo de avaliação de homeostase (HOMA-IR) seguindo a metodologia de Treiber (2005), com suas respectivas fórmulas descritas abaixo:

$$\begin{aligned}
 G:I &= \text{glicose/insulina} \\
 RISQI &= 1/\sqrt{\text{insulina}} = \text{insulina}^{-0,5} \\
 MIRG &= (800 - 0,3 [\text{insulina} - 50]^2) / (\text{glicose} - 30) \\
 HOMA - IR &= \text{glicose (mg/dL)} \times 0,0555 \times \text{insulina } (\mu\text{U/ml}) / 22,5
 \end{aligned}$$

Como parâmetros de normalidade, considerou-se valor da relação de G:I > 10, RI compensatória entre 4,5 a 10 e quadro severo de RI se < 4,5 (Treiber et al. 2005, Treiber et al., 2006). Para RISQI normal > 0,32, entre 0,22 e 0,32 RI e < 0,22 RI severa. Para MIRG normal < 5,6 e para HOMA-IR, considerou-se RI quando o valor era superior à 2,71 (Geloneze, Tambascia, 2006).

2.8.Teste de Baixa Dose de Glicose Oral (TBDGO)

O teste foi realizado antes do início do fornecimento da dieta experimental (basal), 90 e 150 dias após o fornecimento da dieta. Após um período de jejum alimentar prévio de 12 horas, administrou-se glicose (0,25g/kg) via sonda nasogástrica. Amostras de sangue foram coletadas previamente nos momentos basal, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. após a administração da dextrose. As amostras sanguíneas foram utilizadas para mensurar a glicose e a insulina plasmática.

Para interpretação dos resultados considerou-se que em animais sadios a glicose apresentará um pico de 90 a 120 mg/dL entre as coletas realizadas nos momentos 60 e 90 min. e a insulina deverá estar abaixo de 20 μ UI/mL após as amostras coletadas nos momentos 60 e 90 min. (Ralston, 2002).

Também foram calculadas as áreas totais abaixo da curva (AT), definidas como sendo as áreas abaixo das curvas da glicose e de insulina, até o eixo das abscissas. Essas foram obtidas através do cálculo numérico da integral da curva e expressas em mg/dL/min, originada dos valores de glicose (ATG) e de insulina (ATI) obtidos no TBDGO (Correa et al., 2007).

2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Adotando-se um programa computacional de estatística (Sigma Stat, Systat), os dados com distribuição normal foram analisados com análise de variância em blocos ao acaso com medidas repetidas pelo tempo, seguidos pelo teste de Tukey para comparação entre as médias. Para os dados não paramétricos das variáveis ECC e ECP medidas repetidas pelo tempo, utilizou-se o teste de Friedman. Para todos os testes, considerou-se nível de significância de $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

Durante o período experimental, os equinos consumiram diariamente uma média de 0,94% ($\pm 0,02$) de concentrado e 1,72% ($\pm 0,04$) de volumoso em relação ao peso vivo. Não houve ocorrência de cólicas ou evidências de claudicação e sinais de sensibilidade do casco pela avaliação da pinça de casco.

Ao final do período, os animais apresentaram um ganho médio de peso correspondente a 27,45% do original, apresentando valores significativos ($P < 0,001$) já a partir da mensuração realizada em seu início (Tabela 4). Já o ECC, ECP e circunferências de pescoço 25% e 75% apresentaram valores significativos nos 75 dias e a circunferência a 50% foi significativa já aos 45 dias (Tabela 5). A UBC apresentou alterações significativas aos 60 dias de experimento, com um acréscimo de 268% em relação ao valor basal após 150 dias da indução da obesidade (Tabela 6).

Tabela 4: Médias e desvios-padrão de peso, escore de condição corporal (ECC) segundo Henneke et al. (1983) e escore da crista de pescoço (ECP) segundo Frank et al., (2006) de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade.

Tempo (dias)	Peso (Kg)		ECC [‡]		ECP [‡]	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Basal	316	62,68	2,88	1,05	1,72	0,56
15	348,44**	69,6	3,72	1,22	1,94	0,39
30	348,55**	71,18	4,94	1,15	2,72	0,56
45	356,22**	66,2	6,05	0,88	2,77	0,44
60	356,22**	66,2	6,05	0,88	2,77	0,44
75	375,55**	66,4	7,5*	0,7	2,5*	0,5
90	386**	65,15	8*	1	2,88*	0,33
105	390,22**	61,88	8,33*	1	2,88*	0,41
120	394,55**	63,56	8,33*	0,96	2,88*	0,33
135	400,77**	58,77	8,5*	1,06	2,88*	0,33
150	402,77**	58,31	8,5*	1,06	2,88*	0,33

Teste de Tukey, [‡] teste de Friedman, valor de P significativo $\leq 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$

Tabela 5: Médias e desvios-padrão de mensuração da circunferência do pescoço (MCP), mensurando as 25, 50 e 75% da distância entre a nuca e a cernelha de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade.

Tempo (Dias)	Medida da Circunferência do Pescoço					
	25% (cm)		50% (cm)		75% (cm)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Basal	64,27	4,36	74,31	4,68	93,88	6,16
15	64,31	4,52	76,7	6,04	93,41	6,93
30	66,72	3,77	79,54	5,46	97,85	7,88
45	68,27	3,35	83,01*	4,29	100,9	4,69
60	69,44	3,23	83,66*	4,4	102,2	5,76
75	72,44*	3,64	88,56***	3,56	107,8**	5,66
90	72,27*	3,45	90,11***	5,12	107,2**	6,65
105	72,88**	5,68	89,38***	4,49	109,7***	6,14
120	74,05**	5,23	92,16***	5,05	110,7***	6,18
135	74,05**	5,23	92,16***	5,05	110,7***	6,18
150	74**	3,75	91,5***	3,64	114***	5,01

Teste de Tukey, valor de P significativo $\leq 0,05$, * P<0,05, ** P<0,001, *** P<0,0001

Não se verificaram alterações significativas para PAM e valores plasmáticos de triglicérides e a VLDL-c (Tabelas 6). Em contraponto o LDL-c apresentou elevação significativas nas coletas realizadas nos tempos 75, 135 e 150, também houve alteração significativa em nos valores de HDL-c, que apresentaram um comportamento de parábola. Houve um período inicial de elevação significativa no trigésimo dia (P<0,05) e finalizando após 90 dias (P<0,05) e voltando a demonstrar um aumento significativo na coleta realizada no tempo 135 dias com valor de P menor do que 0,05 e voltando a diminuir na coleta 150 (Tabela 7).

Tabela 6: Médias e desvios-padrão da pressão arterial média (PA) e as medidas de espessura do tecido adiposo localizado na base da cauda através do uso de exame ultrassonográfico (UBC) de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade e os valores de referência para a PAM e VLDL-s.

Tempo (Dias)	PAM (mmHg)		UBC (mm)		VLDL-c (mg/dL)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Basal	81,55	7,54	3	1,32	3,61	1,61
30	82,33	7,46	5,92	2,3	2,69	1,42
60	90,96	13,99	12,92**	3,64	2,73	2
90	87,03	9,09	19,4**	3,63	2,57	1,94
120	86,81	13,38	20,44**	4,21	3,84	1,87
150	81,46	18,52	20,96**	4,87	3,9	1,49
Valores de Referência	89,75 [§]	13,55	-	-	0,77 - 3,09 [¶]	-

Teste de Tukey, valor de P significativo de $\leq 0,05$, * P<0,05, ** P<0,001, *** P<0,0001. UBC: ultrassonografia da base da cauda, PA: Pressão arterial, VLDL: Very low density lipoprotein. [§]Johnson et al., 1976, [¶] Yamamoto et al., 1979.

Tabela 7: Médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos de triglicérides (TRI), LDL-c e HDL-c de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade e seus respectivos valores de referência.

Tempo (Dias)	TRI (mg/dL)		LDL-c (mg/dL)		HDL-c (mg/dL)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Basal	18,06	8,07	17,35	5,84	49,7	13,5
15	21,5	10,17	16,68	7,56	57,86	29,15
30	13,51	7,11	25,37	10,56	85,57*	32,19
45	15,29	9,6	27,64	9,13	101,7**	11,38
60	13,71	10,01	29,47	17,17	82,18*	30,58
75	18,95	13,1	33,91*	9,87	91,06**	14,83
90	12,88	9,73	29,8	12,86	79,58*	25,35
105	11,69	10,16	28,53	13,48	72,13	27,53
120	10,6	4,72	19,22	5,2	61,78	14,43
135	19,25	9,4	32,6*	7,84	80,53*	9,4
150	19,55	7,46	37,75**	13,66	73,88	7,31
Valores de Referência	4 - 44 [©]	-	24,63 – 38,87 [‡]	-	52,20 – 62,26 [‡]	-

Teste de Tukey, valor de P significativo $\leq 0,05$, * P<0,05, ** P<0,001, *** P<0,0001. HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, [©] Kaneko et al., 1997, [‡] Yamamoto et al., 1979.

As concentrações plasmáticas de colesterol total apresentaram elevação significativa já na coleta realizada no tempo 30 (P<0,05), se mantendo significativo até o final do período experimental. O pico ocorreu no quadragésimo quinto e septuagésimo quinto dia (P<0,001) (Tabela 8).

Tabela 8: Médias e desvios-padrão valores plasmáticos de colesterol e dos ácidos graxos não esterificado (AGNE) de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade e seus respectivos valores de referência.

Tempo (Dias)	Colesterol (mg/dL)		AGNE (mmol/L)	
	Média	DP	Média	DP
Basal	67,21	17,9	0,048	0,041
15	91,94	22,38	0,037	0,044
30	120,7*	36,77	0,032	0,02
45	134**	25,24	0,019	0,007
60	116,6*	53,8	0,059	0,027
75	134,8**	32,05	0,045	0,022
90	122,6*	50,26	0,05	0,024
105	111,7*	47,72	0,057	0,04
120	81,44	18,72	0,055	0,02
135	115,5*	16,64	0,038	0,018
150	117,2*	19,41	0,081	0,046
Valores de Referência	111 [©]	18	0,029 – 0,118 [©]	-

Teste de Tukey, valor de P significativo $\leq 0,05$, * P<0,05, ** P<0,001, *** P<0,0001. AGNE: Ácidos graxos não esterificado. [©] Kaneko et al., 1997.

As concentrações plasmáticas de glicose expressaram alteração apenas na coleta realizada com 45 dias de experimento ($P<0,0001$). Contudo, as concentrações de frutossamina foram superiores ao basal nas coletas realizadas nos tempos 30, 45 e 75 ($P<0,05$).

Tabela 9: Médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos de glicose, frutossamina e insulina de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade e seus respectivos valores de referência.

Tempo (Dias)	Glicose (mg/dL)		Frutossamina ($\mu\text{mol/L}$)		Insulina ($\mu\text{U/mL}$)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Basal	102,37	18,92	181,77	70,28	5,87	3,4
15	88,01	14,74	245,11	53,75	-	-
30	130,24	22,44	270,22*	62,68	15,02*	2,84
45	147,54***	34,07	296,22*	21,63	14,42	7,49
60	102,04	21,34	240,77	105,2	-	-
75	120,07	25,01	282,77*	46,92	20,03**	6,28
90	100,2	18,85	236,55	75,41	-	-
105	109,23	20,4	221,55	75,8	18,69**	7,44
120	126,36	16,83	185	42,29	-	-
135	115,43	11,43	248,11	46,29	18,61**	5,52
150	73,65	13,91	229,55	49,38	16,74*	11,64
Valores de Referência	75,6 [©]	8,5	175-280	-	< 20 [©]	-

Teste de Tukey, valor de P significativo $\leq 0,05$, * $P<0,05$, ** $P<0,001$, *** $P<0,0001$. [©] Kaneko et al., 1997, [©] Frank et al., 2010.

Entre os “proxies”, o G:I e o RISQI se comportaram de maneira similar, apresentando redução significativa em relação ao basal já na primeira coleta após o início do fornecimento da dieta hipercalórica ($P<0,0001$) e se mantendo assim até o fim do experimento. No entanto, o MIRC apresentou aumentos significativos aos 75 e 105 dias de experimento ($P<0,05$) e alternando os dois últimos valores em não significativo na coleta 135 dias de experimento ($P=0,18$) e significativo na coleta realizada após 150 dias de experimento ($P<0,0001$). O HOMA-IR apresentou aumentos significativos nas coletas 45 ($P<0,05$), 75 ($P<0,001$), 105 ($P<0,001$), 135 ($P<0,001$) e 150 ($P<0,05$), diminuindo o seu valor na última coleta (Tabela 10).

Em relação às concentrações de insulina plasmática basal, houve elevação de até 156,67% já nos 30 primeiros dias de experimento ($P>0,05$) e sua concentração se manteve superior à basal até o final do experimento (Tabela 10).

Tabela 10: Médias e desvios-padrão dos valores plasmáticos dos “proxies” de equinos Mangalarga Marchador submetidos a indução da obesidade.

Tempo (Dias)	G: I (mg/dL/ μ U/mL)		RISQI (μ U/mL ^{-0,5})		MIRG (μ U _{ins} ² /[10.L.mg _{gli}])		HOMA-IR	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Basal	22,87	11,5	0,46	0,13	3,07	1,4	1,5	0,92
30	8,93***	2,32	0,26***	0,03	4,44	0,92	4,85*	1,29
45	12,1***	4,69	0,29***	0,07	3,53	1,2	5,51*	3,66
75	6,29***	1,4	0,23***	0,03	6,04*	1,59	6,02**	2,36
105	6,37***	1,68	0,24***	0,05	6,28**	1,21	5,28*	2,95
135	7,27***	2,26	0,24***	0,03	5,28	1,27	5,79*	1,83
150	6***	2,69	0,28***	0,07	10,07***	3,85	3,24	2,76

Teste de Tukey, valor de P significativo $\leq 0,05$, * P<0,05, ** P<0,001, *** P<0,0001.

G:I: Relação entre a glicose com a insulina, RISQI: sensibilidade à insulina, MIRG: resposta secretória insulínica, HOMA-IR: modelo de avaliação de homeostase

Os resultados de insulina no teste dinâmico TBDGO estão representados na Fig. 6. Antes da dieta, observou-se o pico de insulina entre 60 e 90 minutos após o fornecimento de glicose, com os respectivos valores de 16,67 e 19,36 mg/dL, que reduziram para 10,45 mg/dL na coleta 180 minutos. A análise realizada aos 90 dias apresentou seus dois maiores valores nas amostras coletas aos 60 (31,12 mg/dL) e 90 (33,52 mg/dL) minutos e os valores subsequentes permaneceram elevados até o final da realização do teste. Já ao final do experimento, houve aumento na concentração de insulina já aos 30 minutos (46,45 mg/dL) com pico os 60 minutos (50,17 mg/dL), sendo que os valores permaneceram elevados até a coleta realizada nos 120 minutos (42,05 mg/dL) (Figura 7).

Os resultados de glicose no teste dinâmico TBDGO estão representados na Fig. 7. Antes da dieta, observa se os dois maiores resultados nas coletas 60 (135,5 mg/dL) e 90 (131,5 mg/dL) minutos, com diminuição para 123,0 mg/dL já na coleta realizada aos 120 minutos. Aos 90 dias houve valor basal alto de 105,94 mg/dL em relação aos demais, havendo pico aos 90 minutos (172,62 mg/dL) e queda aos 150 minutos (128,86 mg/dL). Ao final do experimento, o valor basal foi de 65,82 mg/dL com o pico aos 60 minutos (149,12 mg/dL) com o início da diminuição de seu valor na coleta 120 minutos chegando ao seu menor valor em 180 minutos (69,05 mg/dL).

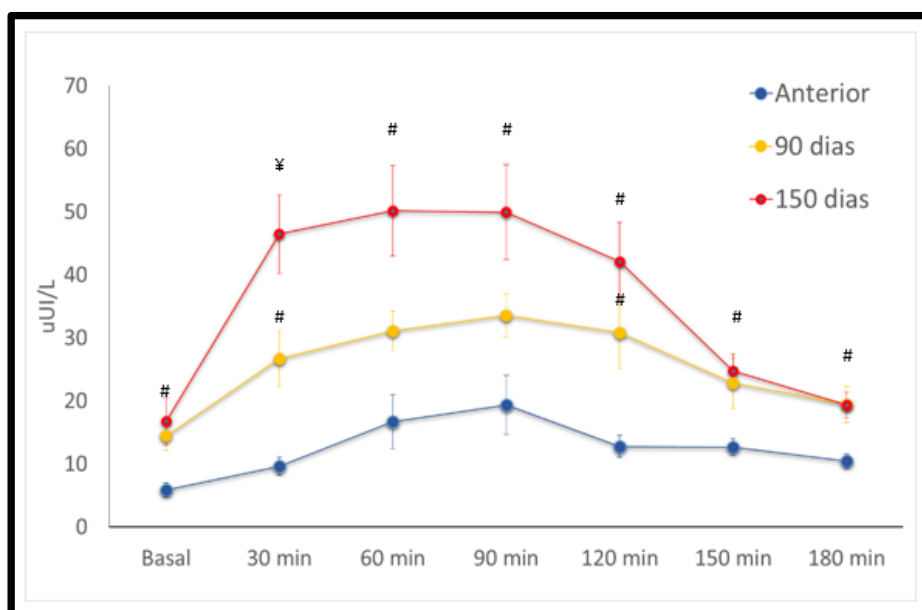


Figura 6: Médias e erros-padrão das concentrações plasmáticas de insulina após a administração gástrica de glicose (0,25 g/kg) em equinos Mangalarga Marchador antes, 90 e 150 dias após a indução da obesidade. Legenda: # Valores significativos em r Valores significativos em relação aos resultados do tempo Anterior, ¥ Valores significativos em relação aos resultados do tempo Anterior e 90 dias.

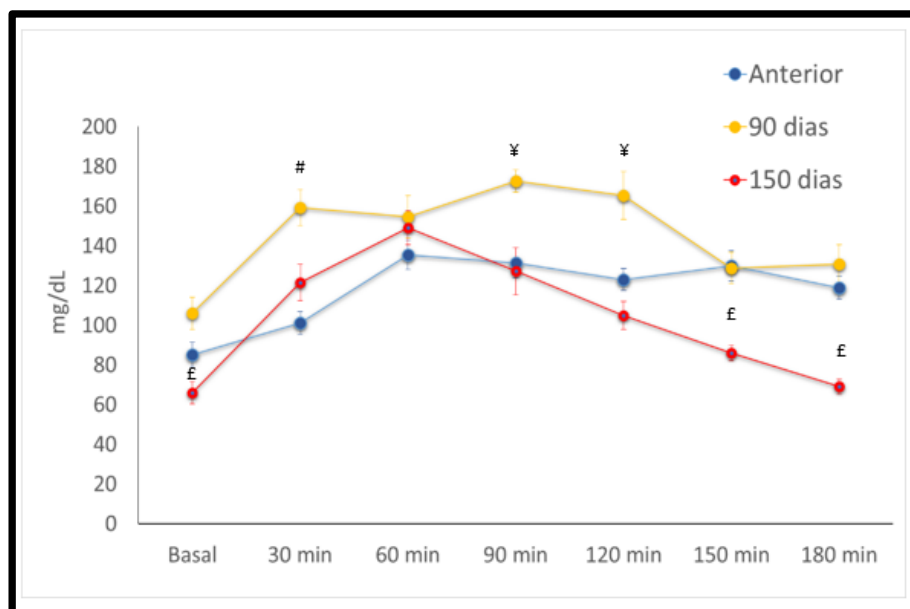


Figura 7: Médias e erros-padrão das concentrações plasmáticas de glicose após a administração gástrica de glicose (0,25 g/kg) em equinos Mangalarga Marchador antes (Controle), 90 e 150 dias após a indução da obesidade. Legenda: # Valores significativos em relação aos resultados do tempo Anterior, ¥ Valores significativos em relação aos resultados do tempo Anterior e 90 dias, £ Valores significativos em relação aos valores dos resultados do tempo 150 e 90 dias.

Os resultados das áreas sob a curva de insulina e glicose estão na Tabela 11. Em relação à insulina, houve aumento significativo já aos 90 dias ($P < 0,05$), se mantendo assim até os 150 dias ($P < 0,001$). Quanto à glicose, houve aumento aos 90 dias ($P < 0,001$) e um valor considerado tendência no tempo 150 dias (0,06).

Tabela 11: Médias e desvios-padrão das áreas sob a curva relativas às concentrações plasmáticas de insulina e glicose após a administração gástrica de glicose (0,25 g/kg) em equinos Mangalarga Marchador antes, 90 e 150 dias após a indução da obesidade.

	Anterior		90 (dias)		150 (dias)	
	Média (μ UI ou mg/dL/min)	DP	Média (μ UI ou mg/dL/min)	DP	Média (μ UI ou mg/dL/min)	DP
Insulina	27545,49	10509,93	56327,64*	24164,73	78569,93**	29015,53
Glicose	25990,22	32361,21	32042,15**	38933,51	22787,52	30514,51

Teste de Tukey, valor de P significativo $\leq 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível verificar, em animais mestiços da raça Mangalarga Marchador, as alterações metabólicas promovidas pela indução da obesidade. Em contra partida quando comparamos os resultados obtidos durante o período experimental com seus respectivos valores de referência podemos constatar que as variáveis PAM, TRI, LDL, COL, AGNE, FRUT e insulina não apresentaram valores acima de seus valores de referências, esse comportamento pode ser um indicativo de que o período experimental tenha sido relativamente curto, para levar a um aumento acima do que é considerado dentro do intervalo da espécie. No entanto os valores de VLDL, HDL e GLI apresentaram valores médios acima dos valores considerados dentro da referência, sinalizando que os animais estavam demonstrando uma alteração metabólica durante o período experimental, essa desregulação metabólica é evidenciada quando observamos detalhadamente as outras variáveis.

Os efeitos da dieta sobre a massa corpórea e acúmulo de gordura regional foram marcantes. Durante o período experimental os animais apresentaram um ganho de peso de 27,5% em relação aos valores iniciais. Como se tratavam de animais no final da fase de desenvolvimento, este aumento de peso se refletiu sobre o acúmulo de tecido adiposo no tecido subcutâneo promovendo um aumento de 2,95 vezes no ECC e um aumento de 1,7 vezes no ECP. Sabe-se que o uso de escores para determinação de adiposidade em equinos apresenta grande variação individual, mesmo por profissionais treinados (Yong et al., 2004, Mottet et al., 2009). Como já constatado por outros autores o ECC não é tão preciso para avaliar o acúmulo de gordura regional, pois essas deposições de gordura ocorrem muitas vezes de maneira assimétrica, dificultando a determinação real da situação corporal do animal (Geor, 2008). Entretanto, esses métodos continuam a ser utilizados na prática, pois possuem correlações significativas com distúrbios metabólicos como DI (Carter et al., 2007).

No presente estudo também foram utilizados métodos mais objetivos como as circunferências do pescoço e o UBC. Sendo detectados aumentos de 15%, 23% e 21% respectivamente nas circunferências tomadas a 25%, 50% e 75% da distância da nuca à cernelha. Estudos realizados por Frank et al. (2006) mostraram que a circunferência cervical apresentou uma estreita correlação com a área sob a curva de insulina, sendo indicado como um fator de risco para o desenvolvimento

de RI em cavalos. As outras MCP manifestaram um aumento de sua mensuração no decorrer do experimento, significando que as mensurações do MCP podem ser utilizadas como medidas objetivas para avaliar o acúmulo de gordura regional. Entretanto, entre as três mensurações a 50% foi a que se destacou previamente, sendo evidenciado como a variável que se sobressai quando o animal tem um ganho de peso, concordando com experimentos prévios de nosso grupo de pesquisa em equinos Mangalarga Marchador (Lima et al. 2010) e de policiamento (Xavier et al. 2014).

O UBC foi considerado o método mais se destacou, por determinar diretamente a deposição de gordura subcutânea, e apresentou um aumento de 7 vezes em relação aos valores basais. O UBC também se mostrou uma alternativa sensível para sinalizar o acúmulo de gordura regional de maneira precoce, apresentando valores significativos nos tempos de coleta 60 dias. O uso de ultrassom é uma técnica que já teve sua eficácia comprovada em identificar o acúmulo de gordura regional em equinos e outros animais de produção (Westervelt et al., 1976, Gee et al., 2003, Dugdale et al., 2010, Silva, Cadavez, 2012). França et al. (2012) concluíram que mensurar a gordura subcutânea na base da cauda é o local de maior confiança para estimar o acúmulo de gordura corporal, concordando com Gentry et al. (2004) que relataram que a região da cauda é o local onde ocorre o maior depósito de gordura no corpo do equino.

Apesar da pressão arterial média (PAM) não apresentar resultados significativos, foi manifestado um pico com elevação média de 11,53% após 60 dias de dieta, mas com um intervalo de desvio padrão considerável. Nesse sentido, alguns estudos demonstraram aumento da resistência vascular, possivelmente associado a vasoconstrição em resposta ao aumento da endotelina 1 (ET-1), em equinos submetidos a infusão de insulina (Gräff et al., 2013). Também foi observado aumento da pressão arterial em pôneis com sinais de resistência à insulina (Bailey et al. 2008).

Entre as teorias para a origem da hipertensão, a modificação do calibre dos vasos é a mais empregada, responsabilizando as lipoproteínas e a insulina circulante através de sua ação aterogênica (DeFronzo, Ferrannini, 1991). A aterogênese é a reação endotelial que desencadeia a aterosclerose, sendo uma doença inflamatória crônica multifatorial. A origem da aterogênese se dá pela ação das lipoproteínas aterogênicas, entre elas a LDL.

As lipoproteínas ficam retidas no espaço sub-endotelial, o LDL começa a sofrer oxidação se tornando imunogênico, e assim começa a estimular a agregação de leucócitos na superfície endotelial. Os leucócitos atraem os monócitos e os linfócitos, os monócitos migram até ao espaço sub-endotelial, se diferenciando em macrófagos, que acaba por fagocitar as LDL oxidadas. Esses macrófagos repletos de lipídios são denominados de células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (Sposito et al., 2007). Acrescido a esses fatores, a insulina pode ativar as proteíno-quinases através de mitógenos, que são responsáveis por inibir a via de fosfoinositide-3-quinase, ocorrendo através da inibição da secreção do vasoconstritor endotelina -1. Essa inibição promove um desequilíbrio, acarretando em quadros de vasoconstrição (Venugopal et al., 2011, Potenza et al., 2005, Peroni et al., 2006). Apesar de aumento das concentrações de LDL plasmático ter sido identificadas no presente estudo, acredita-se que o período experimental tenha sido relativamente curto, para manifestação dessas alterações vasculares.

Entre os biomarcadores de alteração no metabolismo energético, os valores de triglicérides não apresentaram elevação durante o período experimental. Esses achados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que os triglicérides não apresentaram diferença entre o grupo obeso

com RI em relação aos animais não obesos (Frank et al 2006). Esse comportamento poderia ser explicado devido a características intrínsecas do metabolismo dos triglicérides nos equinos, que são uma fonte de energia normalmente mobilizada das reservas de gordura em períodos de inanição ou de privação de alimento (Durham, 2006). Entretanto, outros estudos têm verificado elevação nos valores de triglicérides em equinos com hiperinsulinemia (Durham, 2012), sendo sugerido que os triglicérides possam ser utilizados como um marcador de RI em equinos. Quando o equino passa por um período de privação energética os triglicérides presentes no tecido adiposo são quebrados em AGNE e glicerol, sendo depois carreados para a circulação. Boa parte dos AGNE serão metabolizados no fígado sendo transformados em corpos cetônicos e energia e outra parte será re-esterificada em triglicérides (Jeffcott e Field, 1985).

Os valores de ácidos graxos não esterificados (AGNE) se comportaram de maneira similar aos triglicérides, não apresentando elevação significativa durante o período experimental. Outros estudos têm demonstrado diferença significativa entre o grupo obesos com RI com o grupo não obeso (Frank et al., 2006). Tais autores teorizam que a elevação da concentração dos AGNE é observada em humanos obesos e pessoas que não praticam atividade física, explanando que quando o tecido adiposo chega a sua capacidade máxima de reserva de gordura e através de efeitos inibitórios causados pela insulina na ação do hormônio responsivo da lipase ocorre um influxo elevado dos ácidos graxos nos tecidos não reservatórios de gordura como o tecido muscular. Isso causa acúmulo intracelular de diágliceróis causando a ipotoxidade. Esse termo é usado quando a gordura presente intracelular em tecidos não reservatórios de gordura interfere na sinalização dos receptores de insulina, atuando também na modificação das funções das células β pancreáticas (Boden e Laakso, 2004, Poitout et al., 2002).

Entretanto, os resultados do presente estudo estão de acordo com Elzinga et al, (2016) que analisaram animais com SME em comparação com animais saudáveis. Ressaltando que os AGNE são mobilizados do tecido adiposo pelo hormônio sensível da lipase através da lipólise, essa ação é estimulada pelo glucagon e suprimidos pela insulina. Os AGNE circulantes são convertidos pelo fígado para triglicérides, processo esse também suprimido pela insulina. Por outro lado, os triglicérides circulantes podem ser convertidos em AGNE após a ação da lipase e depois são agregados pelo tecido adiposo (Bonen et al., 2004; Cameron-Smith et al., 2003, Lewis et al., 2002, Schrauwen et al., 2000). A insulina influencia a disponibilidade de glicose e AGNE da circulação por meio da supressão da lipólise e da mobilização do AGNE (Nurjhan et al., 1986, Wasserman et al., 1989).

Concordando com esse experimento, outros estudos não encontraram diferenças entre as concentrações de AGNE entre os grupos com e sem sinais de SME (Suagee et al. 2013; Selim et al. 2015; Elzinga et al, 2016).

Os valores de VLDL-colesterol (VLDL-c) não apresentaram um aumento significativo em suas concentrações. Suagee e colaboradores (2013) apresentaram resultados similares aos desse experimento, onde as concentrações de triglicérides, AGNE e VLDL não aumentaram no período de indução de ganho de peso. Todavia, Frank e colaboradores (2006) verificaram aumento dos valores de VLDL plasmático em animais pertencentes ao grupo obeso com RI sugerindo que obesidade, resistência à insulina e dislipidemia ocorrem concomitantemente em alguns animais. Esses autores acreditam que a elevação de VLDL circulante em animais obesos pode estar correlacionado com a elevação dos valores de AGNE, aumentando a viabilidade de triglicérides.

O tecido adiposo em excesso eleva a liberação de ácidos graxos não esterificados, que serão metabolizados no fígado, estimulando a produção de triglicérides e tendo como consequência o aumento da concentração sanguínea de VLDL-c, esse aumento de colesterol ligado às lipoproteínas estimula a formação de LDL-c (Carr, Brunzell, 2004). Embora os valores de triglicérides e VLDL plasmáticos apresentem um aumento discreto em cavalos e pôneis com obesidade e hiperinsulinemia, eles podem ser utilizados como indicadores em potencial para RI (Frank e Tadros, 2014).

Entretanto os valores de colesterol total apresentaram aumento significativo durante o período experimental, divergindo de outros estudos (Freestone et al. 1992; Forhead et al., 1994, Frank et al, 2006; Elzinga et al. 2016). A hipercolesterolemia desencadeia o aumento concomitante de HDL-c e LDL-c, mas os valores mais confiáveis para acompanhar hiperlipidemia seriam por meio da mensuração dos triglicérides, pois o colesterol sérico e o perfil de lipídeos totais não demonstra a situação nutricional dos cavalos doentes. Isso devido ao fato de que a elevação de colesterol e lipídios em jejum em cavalos saudáveis são menores quando comparados aos valores de triglicérides (Naylor, 1980), situação essa não confirmada neste experimento.

O colesterol livre presente no meio intracelular é esterificado pela enzima acil colesterol-acil transferase (ACAT), e se instala na membrana celular, o VLDL é responsável pela troca dos triglicérides pelos éteres de colesterol com o HDL e LDL (Olson, 1998). O aumento da concentração de HDL-c constatada neste experimento coincide com os valores observados por Frank et al. (2006) e Triber et al. (2006), diferindo das respostas em humanos com síndrome metabólica, Quando o homem está com síndrome metabólica desenvolvem hipertrigliceridemia e baixas concentrações de HDL-c, essas variações ocorrem por que os triglicérides transportados pelo VLDL e quilomícrons são trocados pelo colesterol quando interagem com o HDL-c no plasma, sendo assim, a medida que a concentração de VLDL-c aumenta o HDL-c diminui. A troca de colesterol entre as lipoproteínas acontece através da ação da proteína de transferência de éster de colesterol. Essa variação do comportamento do HDL-c em equinos pode ser explicada devido à ausência da proteína transferência éster colesterol no sangue dos equinos, e apenas uma pequena fração dos LDL-c são derivados do HDL-c (Geelen et al., 2001, Watson et al., 1993).

A principal função da HDL-c é coletar o colesterol livre das membranas celulares, esterificar e transportar o colesterol para o fígado, com sua concentração intimamente relacionada ao volume de colesterol plasmático (Garcia e Oliveira, 1992). Altas concentrações de HDL – colesterol em equinos obesos tem sido associadas à maior atividade da lipase lipoproteica, enzima responsável pela transferência do colesterol da VLDL em excesso para o HDL (Watson et al., 1993, Geelen et al., 2001).

Os valores de LDL-c também apresentaram um aumento significativo durante o período experimental, concordando com o trabalho realizado por Frank et al., (2010) e entrando em desacordo com os resultados obtidos por Frank et al, (2006). A LDL é rica em colesterol e sua principal fonte, atendendo os requisitos extra-hepáticos para a síntese de membranas e hormônios esteroidais (Grundy, 1996).

Dentre os mecanismos homeostáticos afetados, a insulina é um dos principais fatores desencadeantes, atuando na supressão da atividade do hormônio sensível a lipase (HSL), implicando no aumento da lipólise dos tecidos, piorando o quadro de hipertrigliceridemia. Outro mecanismo que é observado é quando ocorre o acúmulo dos AGNE e de lipoproteínas no tecido muscular e hepático, tendo como produto a diminuição da captação de glicose por esses tecidos,

interferindo na gliconeogênese hepática. O impacto nas alterações desses mecanismos leva à autopropagação da hiperlipemia nesses animais (Jeffscoot, Field, 1985, McKenzie, 2011).

A glicemia basal média dos animais utilizados neste experimento demonstrou uma elevação de até 27,22% após 30 dias de dieta experimental, com um pico significativo de 45 dias após o início do fornecimento da dieta, sinalizando que os animais estavam apresentando um comprometimento metabólico. Após esse período, os valores voltaram ao patamar demonstrado antes da dieta. Essa situação de pouca modificação entre os valores de glicose basal tem sido observada em outros trabalhos realizados em equinos obesos (Waller et al. 2011). Os valores de glicose basal raramente estão elevados em equinos com resistência à insulina, isso pode ser responsabilizado devido à produção compensatória de insulina, no sentido de contrapor a resistência à insulina nos tecidos (Morgan et al., 2015). No entanto em animais com SME que apresentem hiperinsulinemia a glicose plasmática é relativamente elevada quando comparados com equinos normais, mesmo estando dentro dos valores de referência estabelecidos, podendo refletir uma redução da sensibilidade à insulina junto com um quadro de hiperinsulinemia compensada (Haritou et al., 2008).

Os valores médios de frutossamina plasmática apresentaram elevação significativa 30, 45 e 75 dias. Acredita-se que a concentração da frutossamina espelhe as concentrações da glicemia média por um período de 2 a 3 semanas, tanto no homem como em algumas espécies animais, sendo utilizada como uma medida de controle em contraste com as mensurações individuais de glicose. A frutossamina tem a característica de não sofrer interferência de fatores temporários como a alimentação ou período de estresse recentes (Reusch et al., 1993, Goldstein et al., 2004, Knowles et al., 2012). Estudos recentes têm relatado aumento em seu volume plasmático em animais com laminite clínica e uma correlação positiva em animais com hiperglicemia e hiperinsulinemia basal, essa elevação pode representar um fenômeno transitório associado à sinais clínicos da laminite ou pode durar mais com a laminite sintomática (Knowles et al., 2014).

O nível de capacidade de manutenção de glicose compensatória em equinos com RI é desconhecida e difícil de caracterizar, os valores de glicose em um equino acometido com RI podem variar sutilmente e cavalos obesos com resistência à insulina intersticial dificilmente apresentam variação da concentração de glicose plasmática em relação aos valores basais, tornando a frutossamina como um método alternativo de detectar elevações suaves de glicose ou episódios transitórios de hiperglicemia (Durham et al., 2009, Johnson et al., 2010, Knowles et al., 2012).

Os valores basais de insulina plasmática apresentaram aumento significativo já nos primeiros 30 dias de experimento, contudo de forma mais consistente e duradoura a partir de 75 dias. Os níveis basais de insulina pós-jejum, podem apresentar grande variação entre populações e indivíduos, e alguns autores não tem conseguido verificar diferenças estatísticas entre grupos com e sem sinais de resistência insulínica (Waller et al., 2011). No presente estudo, os animais são de mesma origem, sendo submetidos às mesmas condições e sendo comparados com eles próprios em um delineamento em blocos ao acaso. Indicando que equinos em ganho de peso precisam produzir um volume maior de insulina para aproveitar a glicose, que a propósito se manteve nos valores próximos aos pré-dieta.

Essa elevação dos valores da insulina plasmática pode ser interpretada como um quadro de resistência à insulina compensada desenvolvida por esses animais durante o período de ganho de peso, constatação essa confirmada nos testes de baixa dose de glicose oral (TBDGO) utilizado

neste experimento. Isso fica evidenciado pela da área total sob a curva de insulina, que apresentou uma elevação significativa quando comparando os dados obtidos nos TBDGO nos dias 90 e 150 em relação ao controle. De forma interessante, o valor da área total sob a curva de glicose apresentou uma elevação significativa de glicose apenas no dia 90. Tal achado demonstra que a partir de três meses os animais evoluíram para uma RI compensada, uma vez que a elevação na produção de insulina conseguiu manter os volumes de glicose próximo dos valores obtidos na coleta controle.

Os valores alcançados com os PROXIES ratificam a ideia de que os animais utilizados neste experimento desenvolveram um quadro de resistência à insulina compensada. O valor da proporção de glicose com a insulina (G:I) e do RISQI apresentaram significância a partir de 30 dias de experimento com valor de P menor do que 0,0001 em ambos os casos, revelando que os animais desenvolveram uma alteração metabólica condizente com resistência à insulina, com os resultados de G:I demonstrando resistência à insulina compensatória.

O proxie MIRG expressa a resposta secretória insulínica da célula β do pâncreas em resposta à glicose, demonstrando a capacidade do pâncreas em responder à resistência insulínica dos tecidos e seus resultados foram significativos a partir do dia 75 ($P < 0,05$) e 105 ($P < 0,001$) com uma melhora no dia 135 e uma piora considerável aos 150 ($P < 0,0001$) dias de experimento, expressando assim que os animais sinalizaram uma resposta secretória após 75 dias de experimento.

O comportamento do MIRG se comprova também através dos valores obtidos do HOMA-IR, que foram significativos entre as coletas realizadas no tempo 30 e 135 ($P < 0,05$) dias de experimento com o valor mais significativos no dia 75 ($P < 0,001$), denotando que os animais apresentaram RI no período inicial e se derivando em uma RI compensatória no final do experimento.

O presente estudo concorda com os dados obtidos em cavalos da raça Trotador Americano (Standardbred) submetidos a uma dieta hipercalórica durante 6 semanas, que apresentaram diminuição da sensibilidade à insulina compensada com aumento da produção de insulina plasmática (Sterwart-Hunt et al. 2010). Essa diminuição da sensibilidade à insulina é consistente a outros estudos realizados com equinos em que foi observado uma adaptação à dieta rica em carboidratos não estruturais, podendo alterar a sinalização da insulina e mudar o metabolismo da glicose e dos ácidos graxos (Hoffman et al. 2003; Pratt et al. 2006, Treiber et al. 2005, Jenkins et al. 1987; Samaha et al. 2003).

Os resultados do presente estudo, obtidos pela primeira vez em equinos mestiços da raça Mangalarga Marchador, estão de acordo com estudos internacionais comprovando que o acúmulo de gordura regional está associado com quadros de resistência à insulina, hiperinsulinemia e dislipidemia (Carter et al. 2009, Vick et al., 2008, Johnson, 2002, Sutherland et al., 2004, Vick et al., 2007). Esta associação de acúmulo de gordura com RI pode ser explicada por meio da diminuição da expressão dos receptores de insulina nas células insulino-dependentes. A diminuição da expressão dos receptores pode ser explicada seguindo duas hipóteses, a primeira, de que as adipocinas e citocinas produzidas pelo tecido adiposo atuam nas células insulino dependentes e a segunda devido ao acúmulo de lipídio nos tecidos sensíveis à insulina (Summers, 2006). Acrescentando a isso o receptor de insulina possui um “feedback” negativo em relação à insulina circulante, quanto maior a quantidade de insulina plasmática, menor será a disponibilidade de receptores nas membranas celulares (Shanik et al., 2008).

Outra via que pode interferir na translocação do GLUT-4 seria a ocasionada pelos efeitos tóxicos da hiperglicemia plasmática. A glicose sofre ação da enzima glutamina, dando origem à glucosamina-6-fosfato, e essa glucosamina em excesso pode reduzir a translocação do GLUT-4 (Sposito et al., 2007). A ação comprometida da insulina acaba desencadeando em uma intolerância à glicose, com um aumento relativo da concentração da glicose, mas em equinos que apresentam quadros de RI os valores de hiperglicemia são brandos, essa situação pode ser explicada em equinos pelo fato que a elevação da produção da insulina parece compensar sua ação reduzida se caracterizando como um quadro de resistência à insulina compensada (Cosentino e Luscher, 1998).

5. CONCLUSÃO

A exposição à dieta hipercalórica promoveu aumento de peso e da deposição de gordura total e regional nos locais mensurados neste experimento, com destaque para o ECC, a circunferência do pescoço na porção 50% e o UBC. A indução da obesidade desencadeou um importante impacto no metabolismo dos equinos estudados com aumento nas concentrações sanguíneas de colesterol total, LDL-c e HDL-c. A resistência insulínica ficou evidente já nos primeiros 30 dias, pelo aumento dos níveis plasmáticos basais e pelas alterações em diversos proxies. Até os 90 dias foi possível verificar os efeitos desta resistência sobre o metabolismo da glicose, por meio dos aumentos nas concentrações basais de glicose e frutossamina e pela área sob a curva da glicemia após administração oral de glicose. Contudo, a partir daí, ficou evidente uma compensação pela resposta secretória insulínica das células β do pâncreas, que se manifestou pelo aumento dos níveis plasmáticos de insulina pós jejum ou exposição à glicose gástrica com concomitante redução nos níveis de glicose e frutossamina pós-jejum e pela redução da área sob a curva de glicemia no teste dinâmico. Tais achados comprovam a ocorrência de hiperinsulinemia associada à resistência insulínica e hipercolesterolemia em equinos da raça Mangalarga Marchador expostos a dieta hipercalórica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAEP. Guide for veterinary service and judging of equestrian events. 5ed. Lexington, KY: American Association of Equine Practitioners, 1996. 63p.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev. Br. Epid.*, v. 6, n. 2, p. 158 – 170, 2003.

BAILEY, S. R.; HABERSHON-BUTCHER, J. L.; RANSOM, K. J.; et al. Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 69, n. 1, p. 122-129, 2008.

BAXTER, G. M.; STASHAK, T. S. Examination for Lameness. In: Baxter GM, editor. Adams and Stashak's Lameness in Horses. 1. 6 ed: Wiley-Blackwell; 2011. p. 1272.

BODEN, G.; LAAKSO, M. Lipids and glucose in type 2 diabetes: what is the cause and effect? *Diabetes Care*, v. 27, p. 2253–2259, 2004.

BONEN, A., S. E.; CAMPBELL, C. R.; BENTON, A.; et al. Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/cd36. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 63, p. 245-249, 2004.

CAMERON-SMITH, D.; BURKE, L. M.; ANGUS, D. J.; et al. A short-term, high-fat diet up-regulates lipid metabolism and gene expression in human skeletal muscle. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 77, p. 313-318, 2003.

CARR, M. C.; BRUNZELL, J. D. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 89, p. 2601–2607, 2004.

CARTER, R.; TREIBER, K.; HARRIS, P.; GEOR, R. Evaluation of criteria for pre-laminitic metabolic syndrome. In: Proceedings of the 20th Equine Science Society, Hunt Valley, MD, p. 139–141, 2007.

CARTER, A. C.; GEOR, R. J.; STANIAR, W. B.; et al. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Vet. J.*, v. 179, p. 204–210, 2009.

CORREA, F. H.; NOGUEIRA, V. G.; BEVILÁQUA, M. F.; GOMES, M. B. Avaliação da secreção e resistência insulínica em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose – do metabolismo normal ao diabetes mellitus. *Arq. Bra. Endocrinol. Metaból.*, v. 51, n. 9, p. 1498 – 1505, 2007.

COSENTINO, F.; LUSCHER, T.F. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J. Cardiovasc. Pharmacol., Suppl.*, v. 32, p. S54-S61, 1998.

DeFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin Resistance: A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Diabetes Care.* v. 14, n. 3, p. 173 – 194. 1991.

DONALDSON, M.T.; JORGENSEN, A.J.; BEECH, J. Evaluation of suspected pituitary pars intermedia dysfunction in horses with laminitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 224, p.1123–1127, 2004.

DUGDALE, A. H. A.; CURTIS, G. C.; CRIPPS, P. J.; et al. Effect of dietary restriction on body condition, composition and welfare of overweight and obese pony mares. *Equine Vet. J.*, v. 42, p. 600–610, 2010.

DURHAM, A. E. Clinical application of parenteral nutrition in the treatment of five ponies and one donkey with hyperlipemia. *The Veterinary Record*, v. 158, p. 159 – 164, 2006.

DURHAM, A. E.; HUGHES, K. J.; COTTLE, H. J.; et al. Type 2 diabetes mellitus with pancreatic cell dysfunction in 3 horses confirmed with minimal model analysis. *Equine vet. J.*, v. 41, p. 924-929, 2009.

DURHAM, A. Inter-relationships of hyperinsulinaemia and PPID. Proceedings... 50th British Equine Veterinary Association Congress BEVA, Birmingham, 7 – 10 set, p. 236 – 237, 2012.

ELZINGA, S.; WOOD, P.; ADAMS, A. A. Plasma Lipidomic and Inflammatory Cytokine Profiles of Horses With Equine Metabolic Syndrome. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 40, p. 49–55, 2016.

FONSECA, V.; DESOUZA, C.; ASNANI, S.; et al: Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in diabetes. *Endocrin Vet.* v. 25, p. 153-175, 2004.

Food and Agriculture Organization - FAO. United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>> Acesso em: 20 jul. 2016.

FORHEAD, A. J.; FRENCH, J.; IKIN, P.; et al. Relationship between plasma insulin and triglyceride concentrations in hypertriglyceridaemic donkeys. *Res. Vet. Sci.*, v. 56p. 389–392, 1994.

FRANÇOSO, R.; MARTINS, R.A.D.T.; GONZAGA, I.V.F.; et al. Avaliação do escore corporal em equinos por meio da ultrassonografia. *Rev. Ed. Con. Med. Vet. Zoot.*, v. 10, n. 1, 2012.

FRANK, N.; ELLIOTT, S. B.; BRANDT, L. E.; KEISLER, D. H. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *JAVMA*, v. 228, n. 9, p. 1383 - 1390, 2006.

FRANK, N.; GEOR, R. J.; BAILEY, S. R.; et al. Equine Metabolic Syndrome. *J. Vet. Intern. Med. V.*, v. 24, p. 467 – 475, 2010.

FREESTONE, J. F.; BEADLE, R.; SHOEMEKER, K.; et al. Improved insulin sensitivity in hyperinsulinaemic ponies through physical conditioning and controlled feed intake. *Equine Vet. J.*, v. 24, p. 187–190, 1992.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY R. I.; FREDRICSON D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, Baltimore, v. 18, n. 6, p. 499 - 502, 1972.

GALANTINO-HOMER, H., LINARDI, R., ENGILES, J., et al., Investigating sérum biomarkers for equine laminitis. *J. Eq. Vet. Sci.*, v. 33, p. 863, 2013.

GAUFF, F., PATAN-ZUGAJ, B., LICKA, T. F. Hyperinsulinaemia increases vascular resistance and endothelin-1 expression in the equine digit. *Equine Vet J.*, v.45, n. 5, p. 613–618, 2013.

GEE, E. K.; FENNESSY, P. F. Chemical body composition of 20 thoroughbred foals at 160 days of age, and preliminar investigation of techniques used to predict body fatness. *New Zealand Vet. J.*, v. 51, n. 3, p. 125-131, 2003.

GEELLEN, S. N.; JANSEN, W.L.; VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M.; et al. Fat feeding increases equine heparin-released lipoprotein lipase activity. *J. Vet. Intern. Med.* v. 15, p. 478–481, 2001.

- GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arquivo brasileiro de endocrinologia e metabologia*. V. 50, n. 2, p. 208 – 215, 2006.
- GENTRY, L.; THOMPSON, D.; GENTRY, G.; et al. The relationship between body condition score and ultrasonic fat measurements in mares of high versus low body condition. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 24, p. 198–203, 2004.
- GEOR, R. J.; THATCHER, C. D.; PLEASANT, R. S.; et al. Prevalence of hyperinsulinemia in mature horses: relationship to adiposity [abstract]. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 21, n. 3, p. 601, 2007.
- GEOR, R. J. Metabolic Predispositions to Laminitis in Horses and Ponies: Obesity, Insulin Resistance and Metabolic Syndromes. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 28, n. 12, p. 753 – 759, 2008.
- GOLDSTEIN, D. E.; LITTLE, R. R.; LORENZ, R. A.; et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care.*, v. 27, p. 1761-1773, 2004.
- GRÄFF, J.; KAHN, M.; SAMIEI, A.; et al. A dietary regimen of caloric restriction or pharmacological activation of SIRT1 to delay the onset of neurodegeneration. *J. Neurosci.*, v. 33, p. 8951–8960, 2013.
- GRUNDY, S. M. Dietary fat. In: ZIEGLER, E. E.; FILER JR., L. J. (Ed.). *Present knowledge in nutrition*. 7. ed. Washington: ILSI, 1996. 44-57 p.
- HARITOU, S. J.; ZYLSTRA, R.; RALLI, C.; et al. Seasonal changes in circadian peripheral plasma concentrations of melatonin, serotonin, dopamine and cortisol in aged horses with Cushing's disease under natural photoperiod. *J. Neuroendocrinol.*, v. 20: p. 988–996, 2008.
- HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, v. 21, p. 897-909, 1983.
- HOFFMAN, R. M.; BOSTON, R. C.; STEFANOVSKI, D.; et al. Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. *J. anim. Sci.*, v. 203, p. 2333-2342, 2003.
- JEFFSCOTT, L. B.; FIELD, J. R. Current concepts of hyperlipaemia in horses and ponies. *Vet. Rec.*, v. 116, n. 17, p. 461-466, 1985.
- JENKINS, D. J.; WOLEVER, T. M.; COLLIER, G. R.; et al. Metabolic effects of a lowglycemic- index diet. *Am. J. clin. Nutr.*, v. 46, p. 968-975, 1987.
- JOHNSON, J. H.; GARNER, H. E.; HUTCHESON, D. P. Ultrasonic measurement of arterial blood pressure in conditioned thoroughbreds. *Equine Veterinary Journal*, v. 8, n. 2, p. 55-57, 1976.
- JOHNSON, R. N.; METCALF, P. A.; BAKER, J. R. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta.*, v. 127, p. 87-95, 1983.

- JOHNSON, P. The equine metabolic syndrome peripheral cushing's syndrome. *Vet. Clin. Equine Pract.*, v. 18, p. 271–293, 2002.
- KANE, R. A.; FISHER, M.; PARRETT, D.; LAWRENCE, L. M. Estimating fatness in horses. Proceedings of the 10th Equine Nutrition and Physiology Society Symposium; 1989; Fort Collins, CO. p.127-131.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego, California, ed. Academic Press, 5^o Edição, 1997.
- KNOWLES, E. J.; WITHERS, J. M.; MAIR, T. S. Increased plasma fructosamine concentrations in laminitic horses. *Equine Vet. J.*, v. 44, p. 226–229, 2012.
- KNOWLES, E. J.; MENZIES-GOW, N. J.; MAIR, T. S. Plasma fructosamine concentrations in horses with pituitary *pars intermedia* dysfunction with and without laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 46, p. 249–251, 2014.
- KRUSIC, L.; KRUSIC-KAPLJA, A.; CESTNIK, V. Insulin response after oral glucose application in growing Lipizzaner foals. In: Proceedings of the 15th Equine Nutrition and Physiology Symposium. Fort Worth, TX. Lexington (KY): ENPS 1997. p. 397–403.
- LEWIS, G. F.; CARPENTIER, A.; ADELI, K.; GIACCA A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr. Ver.*, v. 23, p. 201-229, 2002.
- LIMA, I.R.; LIMA, L.R.; VARELLA, J. A. R. C. et al. Diferentes métodos de avaliação da adiposidade em éguas da raça Mangalarga Machador. . In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 11., 2010, Belo Horizonte. *Anais...* São Paulo: ABRAVEQ, 2010. p.76.
- LOWRY, G. F. Special unit and medical school laboratory technicians in New Zealand. A follow-up review and survey of training and qualifications 1970-1975. *New Zealand Med. J.*, v. 12, n. 5, p. 579, 1977.
- McGOWAN, C. M.; McGOWAN, T. W. Prevalence and risk factors for hyperinsulinemia in ponies [abstract]. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 22, n. 3,p. 734, 2008.
- McKENZIE, H. C. Equine hyperlipidemias. *Vet. Clin. Equine.* v. 27, p. 59-72, 2011.
- MORGAN, R. A.; MCGOWAN, T. W.; MCGOWAN, C. M. Prevalence and risk factors for hyperinsulinaemia in ponies in Queensland, Australia. *Australian Vet. J.*, v. 92, p. 101-106, 2012.
- MORGAN, R.; KEEN, J.; McGOWAN, C. Equine Metabolic Syndrome. *Vet. Record.*, v. 15, p. 173 – 179, 2015.
- MOTTET, R.; ONAN, G.; HINEY, K. Revisiting the Henneke Body Condition Scoring System: 25 Years later. v.29, n. 5, p. 417-418, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requirements of horses. 6.ed. Rev. Washington, D.C.: National Academies, 2007. 360p.

NAYLOR, J. M.; KRONFELD, D. S.; ACLAND, H. Hyperlipemia in horses: effects of undernutrition and disease. *American J. Vet. Res.*, v. 41, n. 6, p. 899 – 905, 1980.

NURJHAN, N.; CAMPBELL, P. J.; KENNEDY, F. P.; et al. 1986. Insulin dose-response characteristics for suppression of glycerol release and conversion to glucose in humans. *Diabetes*, v. 35, p. 1326-1331, 1986.

OLSON, R. E. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.*, v. 128, n. 2, p. 439-443, 1998.

PERONI, J. F.; MOORE, J. N.; NOSCHKA, E.; et al. Predisposition for vasoconstriction in the equine lamellar dermis: implications in equine laminitis. *J. Appl. Physiol.*, v.100, p.759–763, 2006.

PLACE, N. J.; MCGOWAN, C. M.; LAMB, S. V.; et al. Seasonal Variation in Serum Concentrations of Selected Metabolic Hormones in Horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 24, p. 650–654, 2010.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R. P. Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes – a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*, v. 143, n. 2, p. 339 – 342, 2002.

POTENZA, M. A.; MARASCIULO, F. L.; CHIEPPA, D. M.; et al. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 289, p. H813–H822, 2005.

PRATT, S. E.; GEOR, R. J.; McCUTCHEON, L. J. Effects of dietary energy source and physical conditioning on insulin sensitivity and glucose tolerance in Standardbred horses. *Equine vet. J., Suppl.*, v. 36, p. 330-334, 2006.

RALSTON, S. L. Postprandial hyperglycemia/insulinemia in young horses with osteochondritis dissecans lesions. *J. Anim. Sci.*, v. 73, p. 184, 1995.

RALSTON, S. L. Insulin and glucose regulation. *Vet. Clin. N. Ame. Equine Pract.*, v. 18, p. 295-304, 2002.

REUSCH, C. E.; LIEHS, M. R.; HOYER, M.; VOCHEZER, R. Fructosamine. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 7, p. 177-182, 1993.

RUGH, K. S.; GARNER, H. E.; SPROUSE, R. F.; HATFIELD, D. G. Left ventricular hypertrophy in chronically hypertensive ponies. *Lab. Anim Sci.*, v. 37, n. 3, p. 335–338, 1987.

SAMAHA, F. F.; IQBAL, N.; SESHADRI, P.; et al. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N. Engl. J. Med.*, v. 348, p. 2074-2081, 2003.

- SCHRAUWEN, P.; WAGENMAKERS, A. J.; VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D.; et al. 2000. Increase in fat oxidation on a high-fat diet is accompanied by an increase in triglyceride-derived fatty acid oxidation. *Diabetes*, v. 49, p. 640-646, 2000.
- SELIM, S.; ELO, K.; JAAKKOLA, S.; et al. Relationships among Body Condition, Insulin Resistance and Subcutaneous Adipose Tissue Gene Expression during the Grazing Season in Mares. 2015
- SHANIK, M. H.; XU, Y.; SKRHA, J.; et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*, v. 31, Suppl. 2, p. S262-S268, 2008.
- SILVA, S.; CADAVEZ, V. P. Real-time ultrasound (RTU) imaging methods for quality control of meats. In D. W. Sun (Ed.), *Computer vision technology in the food and beverage industries*. v. 238, p. 277-329, 2012.
- SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A.; et al. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Br. Cardiol.*, v. 88, Supl. I, p. 4, 2007.
- STEWART-HUNT, L.; PRATT-PHILLIPS, S.; McCUTCHEON, L. J.; GEOR, R. J. Dietary energy source and physical conditioning affect insulin sensitivity and skeletal muscle glucose metabolism in horses. *Equine vet. J.*, 2010, v. 42, Suppl. 38, p. 355-360.
- SUAGEE, J. K.; CORL B. A.; CRISMAN, M. V.; et al. Relationships between Body Condition Score and Plasma Inflammatory Cytokines, Insulin, and Lipids in a Mixed Population of Light-Breed Horses. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 27, p. 157-163, 2013.
- SUMMERS, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progr. Lipid Res.*, v. 45, p. 42-72, 2006.
- SUTHERLAND, J. P.; MCKINLEY, B.; ECKEL, R. H. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, v. 2, p. 82-104, 2004.
- THATCHER, C. D.; PLEASANT, R. S.; GEOR, R. J.; ELVINGER, F. Prevalence of overconditioning in mature horses in southwest Virginia during the summer. *J. Vet. Int. Med.*, v. 26, p. 1413-1418, 2012.
- TREIBER, K. H.; BOSTON, R. C.; KRONFELD, D. S.; et al. Insulin resistance and compensation in Thoroughbred weanlings adapted to high-glycemic meals. *J. anim. Sci.*, v. 83, p. 2357-2364, 2005.
- TREIBER, K. H.; KRONFELD, D. S.; HESS, T. M., Byrd; et al. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.228, n. 10, p. 1538-1545, 2006.
- VALBERG, S. e FIRSHMAN, A. N. N. A. Insulin Resistance—What Is It and How Do We Measure It?. *Advances in Equine Nutr. IV*, p. 355, 2009.

VASQUES, A. C. J.; ROSADO, L. E. F. P. D. L.; ROSADO, G. P.; et al. (2009). Habilidade de indicadores antropométricos e de composição corporal em identificar a resistência à insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*.

VENUGOPAL, C. S.; EADES, S.; HOLMES, E. P.; BEADLE, R. E. Insulin resistance in equine digital vessel rings: an in vitro model to study vascular dysfunction in equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 43, p. 744–749, 2011.

VICK, M. M.; ADAMS, A. A.; MURPHY, B. A.; et al. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *J. An. Sci.*, v. 85, n. 5, p. 1144–55, 2007.

VICK, M. M.; MURPHY, B. A.; SESSIONS, D. R.; et al. Effects of systemic inflammation on insulin sensitivity in horses and inflammatory cytokine expression in adipose tissue. *Am. J. Vet. Res.*, v. 6, n. 1, p. 130–139, 2008.

WALLER, A. P.; BURNS, T. A.; MUDGE, M. C.; et al. Insulin Resistance Selectively Alters Cell-Surface Glucose Transporters but not their Total Protein Expression in Equine Skeletal Muscle. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 25, p. 315–321, 2011.

WASSERMAN, K.; MCILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *Am. J. Cardiol.*, v. 14, p. 844-852, 1964.

WATSON, T. D.; BURNS, L.; FREEMAN, D. J.; et al. High density lipoprotein metabolism in the horse (*Equus caballus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, v. 104, p. 45–53, 1993.

WESTERVELT, R. G.; STOUFFER, J. R.; HINTZ, H. F.; SCHRYVER, H. F. Estimating fatness in horses and ponies. *J. Anim. Sci.*, v. 43, p. 781-785, 1976.

WYLIE, C. E.; COLLINS, S. N.; VERHEYEN, K. L. P.; NEWTON, R. Epidemiological aspects of equine laminitis in Great Britain: 2009-2011. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 839 – 840, 2013.

XAVIER, V. F.; LIMA, I. R.; MARVAL, C. A. D.; et al. Estudo radiográfico do posicionamento da falange distal e sua correlação com obesidade em equinos de patrulhamento da Polícia Militar do estado de Minas Gerais. *Ass. Br. Med. Vet. Zoot.* v. 66, n. 3, p. 672 – 680, 2014.

YAMAMOTO, M.; TANAKA, Y.; SUGANO, M. Lipid composition and cholesterol esterification in serum lipoprotein fraction of the horse, *Equus Caballus*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, v. 63, n. 3, p. 441-449, 1979.

YOUNG, M. G.; TOKACH, M. D.; AHERNE, F.X.; et al. Comparison of three methods of feeding sows in gestation and the subsequent effects on lactation performance. *J. Anim. Sci.* ,v. 82, p. 3058-3070, 2004.

CAPÍTULO 3

RELAÇÃO ESPACIAL ENTRE A FALANGE DISTAL E O ESTOJO CÓRNEO EM EQUINOS COM OBESIDADE INDUZIDA

RESUMO

A Síndrome Metabólica Equina (SME) se caracteriza pela associação de disfunções como a obesidade e a resistência à insulina. O termo SME tem sido proposto para cavalos cujos resultados do exame clínico sugerem um risco aumentado para o desenvolvimento de laminite. O objetivo foi avaliar por meio do exame radiográfico a relação espacial entre o estojo córneo e a falange distal em equinos que passaram por um processo de ganho de peso e determinar se o uso de radiografias seriadas pode auxiliar no diagnóstico precoce para a laminite endocrinopática. Foram utilizados 9 equinos adultos com escore corporal (ECC) médio (\pm DP) inicial de $2,9\pm 1$, foram submetidos a indução da obesidade atingido um EC de $8,3\pm 1$ após 150 dias de experimento. Para a análise radiográfica foram coletados os dados antes do fornecimento da dieta hipercalórica e a cada 30 dias durante o período experimental, os dígitos foram radiografados na projeção lateromedial, após a digitalização das imagens foi utilizado o programa computacional Metron Hoof. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA e medidas repetidas e utilizado o teste de Tukey ($P\leq 0,05$). As variáveis consideradas significativas foram o afundamento, espessura da sola, distâncias entre as superfícies dorsais da falange distal e proximal da parede do casco, suporte da pinça, o ângulo palmar e o breakover. Em concordância com estudos observacionais prévios, equinos submetidos a protocolo experimental à base de uma dieta hipercalórica desenvolveram alterações radiográficas no arranjo espacial da falange distal no estojo córneo características da laminite, sem apresentar sintomas clínicos da doença. A ausência de sintomas corrobora a noção de que o desenvolvimento da laminite endocrinopática possui um caráter mais brando e lento, possuindo uma fase subclínica prolongada. Os achados do presente experimento também sugerem que o exame radiográfico seriado pode ser um procedimento eficiente no diagnóstico precoce da laminite endocrinopática em equinos.

Palavras Chave: Cavalos, Laminite, Síndrome metabólica equina, Resistência à insulina.

ABSTRACT

Equine Metabolic Syndrome (EMS) is characterized by the association of dysfunctions such as obesity and insulin resistance. The term EMS has been proposed for horses whose clinical examination results suggest an increased risk for the development of laminitis, which has been adopted because of its similarity to the Metabolic Syndrome in Humans, which is a set of risk factors used to predict the occurrence of coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus in humans. The objective of this experiment was to evaluate the spatial relationship between the corneal case and the distal phalanx in horses that underwent a weight gain process and to determine if the use of Serial radiographs may be used as a procedure to perform an early diagnosis for endocrinopathic laminitis. Eight (9) adult horses with mean body (EC) score (\pm SD) of 2.9 ± 1 were used, they were submitted to a food overload reaching a EC of 8.3 ± 1 after 150 days of experiment. For the radiographic analysis, the data were collected prior to the supply of food overload and every 30 days during the experimental period, the digits were radiographed in the lateromedial projection, after the scanning of the images the Metron Hoof computer program was used. For statistical analysis, ANOVA and repeated measurements were used and the Tukey test ($P \leq 0.05$) was used. The variables considered significant were sinking, sole thickness, distances between the dorsal surfaces of the distal and proximal phalanx of the hull wall, clamp support, palmar angle and breakover. In agreement with previous observational studies, equines submitted to an experimental protocol based on a food overload developed radiographic changes in the spatial arrangement of the distal phalanx in the corneal case, characteristic of laminitis, without presenting symptoms of the disease. The absence of symptoms corroborates the notion that the development of endocrinopathic laminitis has a milder and slower character and has a prolonged subclinical phase. The findings of the present experiment also suggest that serial radiographic examination may be an efficient procedure in the early diagnosis of endocrinopathic laminitis in horses.

Key words: Horses, Laminitis, Equine metabolic syndrome, Insulin resistance.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a obesidade é um problema para a criação dos equinos, muitos proprietários consideram até certo grau de obesidade como normal, aceitável ou até desejável. Características hereditárias, animais ociosos, alterações metabólicas e endócrinas como a síndrome metabólica equina (SME), são fatores que podem promover essa condição (Orsini et al., 2013).

A SME não é uma doença propriamente dita, é um conjunto de anormalidades clínicas identificadas coletivamente em um único paciente, tornando esse indivíduo com uma probabilidade maior de desenvolver laminite (Johnson, 2002). O animal é considerado com SME quando apresenta características fenotípicas como a obesidade, acúmulo de adiposidade regional e resistência à insulina (Frank et al., 2010). Dentre as consequências conhecidas da SME, a laminite é a mais problemática.

Laminite pode ser definida como a falha da união entre a falange distal com a parede interna do casco, sendo originária da ineficiência do tecido lamelar da parede interna do casco de fixar a falange distal na superfície interna da cápsula do casco. O animal com laminite apresenta um quadro de dor exagerado e sinais de claudicação com características próprias (Pollitt, 2004).

Os equinos com SME desenvolvem um quadro de laminite com um perfil clínico diferente da laminite com origem séptica, sua evolução é subclínica, com importantes alterações nas estruturas do casco, antes mesmo de apresentar sintomas. Tais características fazem necessário a determinação de uma técnica para a realização de seu diagnóstico precoce (Walsh et al., 2009). Um meio de diagnóstico eficaz para as alterações estruturais do casco é o exame radiográfico, porém poucos estudos procuram correlacionar os achados radiográficos com as características da síndrome metabólica em equinos (Magalhães et al., 2014). Entretanto, estudos observacionais transversais realizados em raças nacionais demonstram, de forma consistente, uma associação entre sinais de obesidade e alterações de parâmetros radiográficos indicadores de laminite (Vieira et al., 2012, Paz et al., 2013, Magalhães et al., 2014, Xavier et al., 2014).

O objetivo deste experimento foi avaliar, por meio de uma pesquisa experimental provocada, os efeitos da obesidade induzida através do uso de uma dieta hipercalórica sobre variáveis radiográficas da relação espacial entre o estojo córneo e a falange distal em equinos e analisar se a realização de radiografias seriadas pode ser utilizada como um método de diagnóstico precoce para a laminite endocrinopática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados 9 equinos, hígidos, com idade de 4 anos, distribuídos entre 5 fêmeas e 4 machos castrados da raça Mangalarga Marchador, submetidos a uma indução da obesidade conforme descrito no Capítulo 2.

2.2. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

As avaliações radiográficas foram realizadas com o intervalo de 30 dias, com a primeira radiografia realizada antes do início do protocolo de indução do ganho de peso sendo denominada controle e durante todo o período experimental, sendo classificadas como tempo 30, 60, 90, 120 e 150. Para tanto, foram realizadas exposições lateromediais dos dois membros torácicos utilizando o aparelho de raio X (EcoRay CO., Ltd 1060HF – Korea), dotado de distanciador com iluminação laser, com o objetivo de se visualizar a relação espacial entre falange distal e estojo córneo.

As exposições foram realizadas sempre com 80Kv e 2,5mAs, a uma distância padronizada, os membros torácicos foram posicionados simultaneamente sobre uma estrutura de madeira com 10 cm de altura, para possibilitar o melhor posicionamento do cassete radiográfico. Para facilitar a identificação radiográfica da superfície da linha coronária, uma estrutura metálica de 5 cm de comprimento com 3 mm de largura foi posicionada na superfície dorsal do casco.

Após a revelação digital (Regius Model 110), as imagens foram analisadas por meio de programa computacional (Metron-Hoof-Pro, versão 5.19). Sempre antes de realizar as mensurações foi utilizado o comprimento do marcador radiopaco para corrigir o fator de ampliação.

Utilizando a metodologia empregada por Thrall (2002) foram determinadas as seguintes variáveis: distância entre os planos horizontais entre a banda coronária e o ápice do processo

extensor da falange distal (afundamento), profundidade da sola (espessura da sola), ângulo da parede dorsal do casco (ângulo de casco), ângulo entre a superfície distal da falange e o solo (ângulo palmar) distâncias entre as superfícies dorsais da falange distal e da parede do casco proximal (CF proximal) e distal (CF distal), porcentagem do suporte de pinça (suporte de pinça), ângulo da articulação interfalângica distal (Interf. Dist.), ângulo da articulação interfalângica proximal (Interf. Prox.), ângulo entre as superfícies dorsais da falange distal e da parede do casco (rotação) e a distância entre o ápice da falange distal com o ápice distal do tecido córneo (distância de breakover).

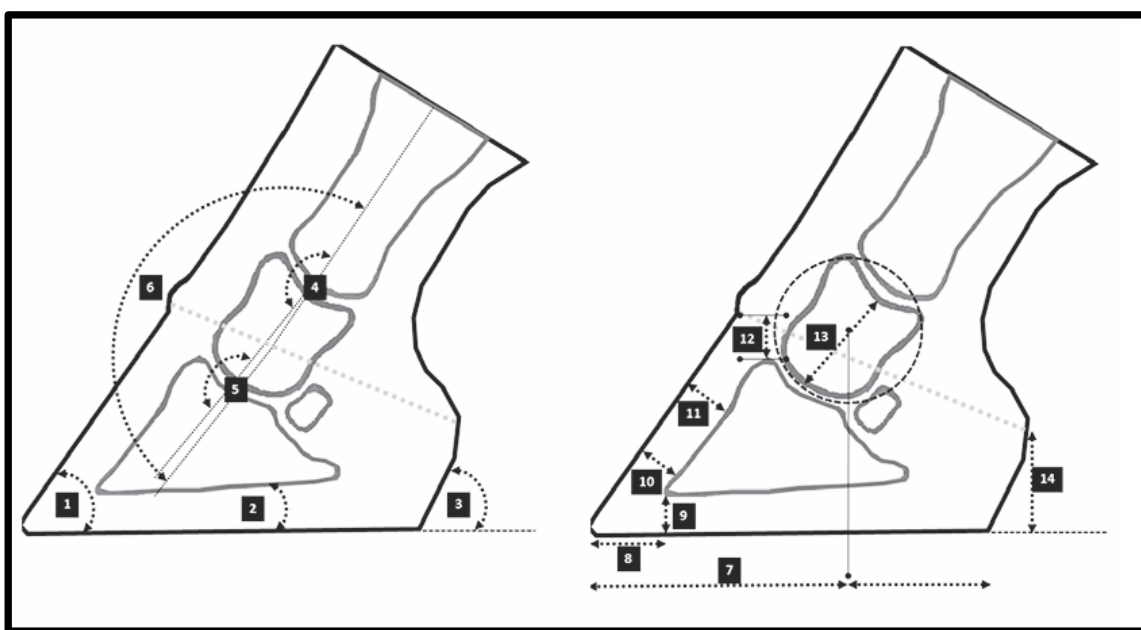


Figura 8: Imagens demonstrando as mensurações realizadas em cascos de membros torácicos os animais utilizados neste experimento por meio do Software Metron Hoof Pro. 1: Ângulo palmar, 2: ângulo palmar da Falange distal, 3: Ângulo da quartela, 4: ângulo da articulação interfalângica proximal (Interf. Prox.), 5: ângulo da articulação interfalângica distal (Interf. Dist.), 6: eixo entre o casco e quartela, 7: suporte do casco, 8: Breakover, 9: Espessura da sola, 10: CF proximal, 11: CF distal, 12: Afundamento, 13: comprimento da falange média, 14: Comprimento da quartela, imagem modificada de Drumond et al., 2016.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Adotando-se um programa computacional de estatística (Sigma Stat, Systat), os dados com distribuição normal foram analisados com análise de variância em blocos ao acaso com medidas repetidas pelo tempo, seguidos pelo teste de Tukey para comparação entre as médias. Na ausência de normalidade, utilizou-se o teste de Friedman. Para todos os testes, considerou-se nível de significância de $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

Os valores médios das variáveis estudadas estão representados nas Tabelas 12 e 13. Destacam-se algumas diferenças significativas. A distância de afundamento apresentou aumento progressivo bilateral, se tornando, aos 150 dias, estatisticamente superior no membro esquerdo. Também no

membro esquerdo observou-se aumento progressivo das distâncias entre as superfícies dorsais (proximal e distal) da falange distal e do estojo córneo, que se tornaram em conjunto estaticamente superiores às basais a partir de 90 dias. Nesse mesmo membro, registrou-se aumento do ângulo palmar a partir dos 120 dias.

Observou-se ainda ao final do experimento, redução bilateral no suporte de pinça da sola e redução da distância de breakover (significativamente apenas no esquerdo).

Tabela 12: Médias e seus respectivos desvios padrões (DP), as variáveis foram obtidas pela avaliação radiográfica do estojo córneo dos membros torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de equinos mestiços da raça manga-larga marchador submetidos indução da obesidade.

	Controle		30		60		90		120		150	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Afundamento MTD (cm)	0,94	0,31	0,95	0,27	1,12	0,29	1,06	0,26	0,89	0,32	1,08	0,22
Afundamento MTE (cm)	0,88	0,37	1,27	0,24	1,02	0,25	1,02	0,27	1,15	0,3	1,23*	0,33
Espessura da Sola MTD (cm)	2,28	0,3	2	0,52	2,18	0,46	2,75	0,4	2,63	0,43	1,79	0,31
Espessura da Sola MTE (cm)	2,22	0,5	1,88	0,42	2,16	0,27	2,66*	0,22	2,64*	0,32	1,84	0,5
Ângulo do Casco MTD (grau)	47,37	3,54	51,72	3,23	50,22	3,54	50,15	3,54	52,02	3,51	52,68	3,93
Ângulo do Casco MTE (grau)	48,12	4,11	51,98	2,34	50,56	3,36	48,22	4,01	49,49	4,36	50,66	3,37
CF Proximal MTD (cm)	1,72	0,15	1,68	0,13	1,68	0,11	1,69	0,13	1,83	0,09	1,8	0,29
CF Proximal MTE (cm)	1,74	0,14	1,92**	0,18	1,91**	0,21	1,94**	0,17	1,98**	0,21	1,9**	0,14
CF Distal MTD (cm)	1,63	0,22	1,52	0,13	1,47	0,19	1,53	0,21	1,72	0,53	1,88	0,78
CF Distal MTE (cm)	1,66	0,21	1,75	0,15	1,79	0,2	2,02**	0,2	2,04**	0,3	1,94*	0,31
Suporte da Pinça MTD (%)	70,94	5,83	69,12	2,77	71,46	3,16	72,8**	3,65	72,07	4,76	62,87**	3,03
Suporte da Pinça MTE (%)	70,81	4,58	69,25	2,93	71,61	2,82	73,99	6,35	69,71	4,61	63,32*	6,17

Teste de Tukey, [‡] teste de Friedman, valor de P significativo $\leq 0,05$, * P<0,05, ** P<0,001. Afundamento: distância entre os planos horizontais entre a banda coronária e o ápice do processo extensor da falange distal, CF prox.: Distâncias entre as superfícies dorsais da falange distal e proximal da parede do casco, Suporte da Pinça: porcentagem do suporte de pinça.

Tabela 13: Médias e seus respectivos desvios padrões (DP), as variáveis foram obtidas pela avaliação radiográfica do estojo córneo dos membros torácico direito (MTD) e esquerdo (MTE) de equinos mestiços da raça manga-larga marchador submetidos indução da obesidade.

	Controle		30		60		90		120		150	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Interf. Distal MTD (grau)	5,13	10,18	5,11	7,2	6,09	9,53	8,14	9,94	8,35	12,08	6,98	9,58
Interf. Distal MTE (grau)	5,59	8,75	2,84	10,08	5,03	8,42	7,65	8,69	5,06	9,49	4,1	9,25
Interf. Prox. MTD (grau)	5,74	3,55	4,68	2,38	3,73	3,93	4	2,52	4,37	3,49	2,99	2,54
Interf. Prox. MTE (grau)	7,44	3,62	4,9	3,32	6,67	3,94	10,21	3,18	4,92	2,8	3,69	3,97
Rotação MTD (grau)	-1,95	2,32	-3,89	3,17	-3,71	2,84	-2,78	2,09	-3,52	2,55	-3,19	3,05
Rotação MTE (grau)	-0,97	1,69	-2,8	1,62	-1,1	3,13	2,06	3,09	1,61	2,96	2,15	3,91
Breakover MTD (cm)	3,04	0,42	2,71	0,27	3,06	0,3	3,3	0,66	3,23	0,63	2,66	0,23
Breakover MTE (cm)	3,36	0,7	3,06	0,35	3,42	0,39	3,88	0,82	3,79	0,46	2,6*	0,57
Ângulo Palmar MTD (grau)	5,74	2	6,36	1,7	5,61	2,65	5,78	2,67	7,41	3,12	7,08	2,73
Ângulo Palmar MTE (grau)	6,07	2,46	6,43	3,02	5,23	3,45	7,68	4,1	7,25	3,22	7,86	3,37

Teste de Tukey, valor de P significativo $\leq 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$. Interf. Dist.: ângulo da articulação interfalângica distal e proximal, Rotação: ângulo de rotação da falange distal, Casco Quartela: Ângulo do eixo casco-quartela, Breakover: Distância entre o ápice da falange distal com o ápice distal do tecido córneo, Ângulo do Casco: ângulo da parede dorsal do casco.

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que equinos submetidos a dieta hipercalórica podem apresentar, a médio prazo, alterações na relação espacial entre a falange distal e o estojo córneo indicadoras de laminite, que mesmo imperceptíveis do ponto de vista clínico, podem ser detectáveis pelo exame radiográfico.

A laminite associada à SME tem como principal característica, quando comparada com a laminite séptica, desencadear uma sensibilidade dolorosa dos cascos mais branda ou mesmo imperceptível aos proprietários. Nesses casos há uma remodelação da interface laminar, que produz de forma lenta alterações na posição da falange distal dentro do estojo córneo. Concordando com os resultados obtidos no presente experimento outros pesquisadores já observaram alterações na relação espacial entre a falange distal e o estojo córneo em equinos com sobrepeso sem que os animais demonstrassem sintomatologia (Paz et al., 2013, Magalhães et al., 2014, Vieira et al., 2012).

O presente estudo apresentou seis variáveis com valores significativos, mas entre os dados analisados que não apresentaram valor significativo foi constatado que algumas variáveis como espessura da sola e o ângulo de rotação demonstraram um aumento do valor médio no decorrer do período experimental, com valor de P considerado como tendência. As insignificâncias desses valores no ponto de vista estatístico podem ser responsabilizadas pelo curto período de tempo em que o presente experimento foi realizado, não sendo longo o bastante para que os animais sinalizassem essas modificações clinicamente, podendo assim ser denominada de subclínica.

É importante ressaltar que, conforme verificado no capítulo 2, os animais utilizados neste experimento não desenvolveram sinais de claudicação ou sensibilidade no casco características de laminite. Esse fato coincide com os relatos da laminite endocrinopática, que em seu período inicial induz remodelação no tecido laminar com um enfraquecimento lento e progressivo da conexão entre a falange distal à parede dorsal do casco (Faleiros, 2011).

Dentre as alterações detectadas, destaca-se a distância de afundamento, que apresentou um crescimento de 39% no membro esquerdo. Estudos realizados no Reino Unido indicam que esta variável é a principal na avaliação da severidade e prognóstico da laminite séptica (Cripps, Eustace, 1999, Eustace, 2010). Além do mais, estudos observacionais realizados em raças nacionais têm mostrado que a distância de afundamento é superior em éguas Campolinas obesas em comparação com as normais e que este parâmetro se correlaciona positivamente com medidas de adiposidade em equinos das raças Campolina, Mangalarga Marchador (Magalhães et al., 2014) e com equinos de cavalaria mestiços das raças Crioulo e Brasileiro de Hipismo (Xavier et al., 2014).

Conforme observado no presente estudo, a modificação da porcentagem de força de suporte na pinça de casco e no ângulo da articulação interfalângica proximal é um indicativo de uma remodelação e reposicionamento da falange distal em relação ao estojo córneo. O desenvolvimento de uma lesão do tecido laminar em adição às forças exercidas pelo tendão flexor digital profundo pode desencadear uma mudança no posicionamento da falange distal (Pollitt, 2008).

A alteração na distribuição de apoio entre pinça e talão ocorreu concomitante com a redução da distância de breakover. Breakover é uma expressão inglesa de difícil tradução que indica o último ponto do casco a se afastar do piso quando o animal se locomove. Sabe-se que quanto maior a distância entre a ponta da falange e o ponto de breakover e mais agudo o ângulo dorsal do casco, maior será o tempo e a força demandada pelo animal e tempo para a locomoção do membro. Sabe-se também que esse atraso irá sobrecarregar o tendão flexor digital profundo (O`Grady e Poupard, 2001). Quanto maior forem as medidas do breakover maior será a tensão sobre o tecido laminar quando o animal se locomove (Redden, 2003).

As mudanças no ângulo do casco podem influenciar no padrão da força exercida no tendão flexor superficial, tendão flexor profundo, ligamento assessorio e do ligamento suspensor do boleto (O`Grady e Poupard, 2001). Quando é observado um maior ângulo de rotação da terceira falange é um indicativo de que a falange distal está se afastando da parede dorsal do casco, sinalizando de que possa estar ocorrendo um comprometimento em seu tecido laminar. Essa remodelação pode alterar as forças e aumentar a carga e conseqüentemente elevar o processo inflamatório nessa região (Herthel e Hood, 1999).

Os resultados do presente estudo indicam que o transtorno metabólico provocado pela indução da obesidade, conforme documentado no Capítulo 2, já foi suficiente para produzir um remodelamento do aparato de sustentação da falange distal a ponto alterar sua relação espacial com o estójo córneo. Este é um fator característico da síndrome metabólica equina (SME). A resistência à insulina (RI) é o ponto central dos mecanismos fisiopatológicos da síndrome metabólica equina, a grande maioria dos cavalos e pôneis afetados pela SME apresentam o quadro de obesidade generalizada ou regional.

Vários fatores têm sido implicados nesta alteração espacial aqui relatada. A sobrecarga do tecido lamelar pelo excesso do peso desses animais pode ser considerada como um deles (Tadros e Frank, 2013). Entretanto, as ideias que são mais aceitas como causas para o desenvolvimento de laminite endocrinopática são de que o tecido adiposo é responsável pela liberação de adipocinas e mediadores inflamatórios que promovem um estado inflamatório persistente. Essa condição favorece o desenvolvimento de resistência à insulina, com conseqüente hiperinsulinemia, que por sua vez é capaz de induzir laminite (Summers, 2006).

A hiperinsulinemia (como descrita no capítulo anterior) pode agir no tecido lamelar e assim desencadear as alterações características das laminite em equinos. Vários estudos têm trazido evidências de que a insulina em maior concentração pode se ligar a receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) localizados no tecido laminar, estimulando assim o aumento de suas respostas biológicas. Tais estudos indicam que a ativação dos receptores do IGF-1 induz alterações fenotípicas nos ceratinócitos lamelares que se diferenciam, desacoplando da membrana basal, e iniciam um processo de proliferação que pode resultar em apoptose (Burns et al., 2013, Boucher et al., 2010, Marshall et al., 1984, Kellerer et al., 1993, Hursting, 2014, Chi et al., 2000).

Essas modificações têm sido observadas em equinos que se encontravam na fase de desenvolvimento da laminite induzida por insulina, sendo praticamente inexistente em animais saudáveis. Acredita-se que essa proliferação celular em excesso das células basais do tecido laminar secundário do casco pode enfraquecer o aparato lamelar, se caracterizando como um dos fatores desencadeadores da laminite endocrinopática (Laat et al, 2013, Daradka e Pollitt, 2004).

Segundo outros autores, a hiperinsulinemia em equinos também pode causar disfunção lamelar do casco por meio de alterações hemodinâmicas no dígito, tendo como consequência hipóxia lamelar, ativação excessiva de pró-enzimas metaloproteinases e finalizando com uma lesão no tecido laminar do casco (Carter et al. 2010). A expressão de 17 proteínas lamelares diferentes do grupo controle tem sido relatada em equinos que passaram hiperinsulinemia experimental, indicando existência de aumento da translocação, resposta imune por estresse oxidativo, proliferação celular e diminuição da modificação da pós-transdução e estruturação das proteínas das células de adesão (Asplin et al., 2007, Baron, 2002).

Outra alteração que pode estar envolvida nesse processo é a glicotoxicidade, que pode impulsionar a alterações vasculares, em decorrência da atividade pró-coagulante e pelo dano oxidativo do endotélio, tendo como consequência danos vasculares, isquemia e efeitos pró-inflamatórios estimulando assim a ação das metaloproteinases (McGowan et al., 2007).

Como relatado no Capítulo 2, nenhum dos equinos apresentou sintomatologia clínica de laminite. Este achado permite indicar que os equinos deste estudo desenvolveram uma laminite endocrinopática subclínica. Sustentando essa proposta todos os animais presentes neste experimento desenvolveram, ao final do experimento, anéis divergentes na parede dorsal do casco. Tem sido relatado que tais anéis são observados antes do início dos sintomas clínicos da laminite (Johnson et al., 2004, Karikoski, et al., 2015).

Os anéis observados neste experimento possuíam características divergentes e não concêntricos, notados em animais saudáveis (Eustace, 2010). O tempo para que os anéis divergentes se desenvolvam e sejam perceptíveis é de aproximadamente 3 meses, ocorrendo após a modificação do crescimento da parede dorsal do casco. Formações de anéis divergentes têm sido consistentemente relatados em estudos anatomopatológicos de equinos com laminite crônica (Karikoski et al. 2014; Karikoski et al. 2016).

Mas é importante abordar que, como os dados presentes neste capítulo são oriundos de um projeto de pesquisa em que os animais passaram pelo procedimentos de coleta de diversos dados e entre esses procedimentos a técnica de biópsia do tecido laminar do casco deve ser exposta, devido ao fato de ter sido realizada no membro torácico esquerdo (MTE) antes de ser fornecida a dieta para a indução de obesidade, podendo assim ser teorizado de que a biópsia tenha causado alguma influência no posicionamento da terceira falange no MTE. Influência essa evidenciada pelo fato de que entre as 6 variáveis com resultados significativos, apenas o suporte da pinça demonstrou resultado significativo no membro torácico direito e todas as outras no MTE.

O procedimento da biópsia do tecido laminar realizado antes da indução de obesidade, pode ter causado um processo inflamatório no MTE que em conjunto à indução de obesidade estimulou ainda mais a remodelação do estojo córneo no referido membro, mas é importante frisar que nas mesmas variáveis em que foi observado valores significativos nos MTE dos animais presentes neste experimento também apresentaram alteração não significativa nos MTDs, como demonstrado na análise do afundamento que apresentou uma evolução média de 14% do MTD no mesmo período em que o MTE apresentou valor significativo de P menor do que 0,05, esse comportamento é repetido na espessura da sola do MTD com valores médios superiores no momento 90 e quase igual ao tempo 120 dias em relação aos valores médios do TEM, com um aumento de 20,61% e 15,35% respectivamente.

Esse comportamento das alterações dos valores nos dois membros sem valor significativo não se restringiu apenas as variáveis com resultados significativos no MTE, sendo constatado também nas outras variáveis analisadas neste capítulo. Essa indiossincrasia demonstra que existiu uma influência da indução da obesidade no remodelamento do estojo córneo bilateral, mas, não se deve excluir os efeitos do procedimento realizado no MTE no início do período experimental.

5. CONCLUSÃO

Os equinos submetidos a protocolo experimental à base da dieta hipercalórica desenvolveram alterações radiográficas no arranjo espacial da falange distal no estojo córneo características da laminite, sem apresentar sintomas da doença. A ausência de sintomas corrobora a noção de que o desenvolvimento da laminite endocrinopática possui um caráter mais brando e lento, possuindo uma fase subclínica prolongada. Os achados deste experimento também sugerem que o exame radiográfico seriado pode ser um procedimento eficiente no diagnóstico precoce da laminite endocrinopática em equinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASPLIN, K. E.; SILLENCE, M. N.; POLLITT, C. C.; MCGOWAN, C. M. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *Vet. J.*, v.174, p. 530-535, 2007.

BARON, A.D. Insulin resistance and vascular function. *J. Diab. Comp.* v. 16, p. 92-102, 2002.

BOUCHER, J.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors act as ligand-specific amplitude modulators of a common pathway regulating gene transcription. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p. 17235-17245, 2010.

BURNS, T.A.; WATTS, M.R.; WEBER, P.S.; et al. Distribution of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in the digital laminae of mixed-breed ponies: na immunohistochemical study. *Equine Vet. J.*, v. 45, p. 326-332, 2013.

CARTER, R. A.; MEGEE, S.; ENGILES, J.; et al. Cellular Proliferation Markers in Lamellar Tissue and Skin Measured by Indirect Immunofluorescence. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 30, n. 2, p. 104, 2010.

CHI, M.M.; SCHLEIN, A.L.; MOLEY, K.H. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology.*, v. 141, p. 4784-4792, 2000.

CRIPPS, P. J.; EUSTACE, R. A. Factors involved in the prognosis of equine laminitis in the UK. *Equine Vet. J.*, v. 31, n. 5, p. 433-442, 1999.

DARADKA, M.; POLLITT, C.C. Epidermal cell proliferation in the equine hoof wall. *Equine Vet. J.*, v. 36, p. 236-241, 2004.

de LAAT, M. A.; POLLITT, C. C.; KYAW-TANNER, M. T.; et al. A potential role for lamellar insulin-like growth factor-1 receptor in the pathogenesis of hyperinsulinaemic laminitis. *The Vet. J.* v. 197, p. 302-306, 2013.

DRUMOND, B.; GINELLI, A. M. G.; FALEIROS, R. R.; et al. Hoof capsule distortion and radiographic measurements of the front feet in Mangalarga Marchador horses subjected to athletic training. *Pferdeheilkunde.* v. 31, p. 110 – 118, 2016.

EUSTACE, R.A. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of chronic laminitis in Europe. *Vet. Clinics N. Am.: Equine Practice*, v.26, p.391-405, 2010.

FALEIROS, R.R. Obesidade em equinos: sinal de beleza ou problema de saúde? *Rev. Mangalarga Marchador*, v.52, p.179-183. 2011.

FRANK, N.; GEOR, R. J.; BAILEY, S. R.; et al. Equine Metabolic Syndrome. *J. Vet. Intern. Med. V.*, v. 24, p. 467 – 475, 2010.

HERTHEL, D.; HOOD, D.M. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of chronic laminitis. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Practice*, v.15, p.375-394, 1999.

HURSTING, S.D. Obesity, energy balance, and cancer: a mechanistic perspective. *Cancer Treat. Res.*, v. 159, p. 21-33, 2014.

JOHNSON, P. The equine metabolic syndrome peripheral cushing's syndrome. *Vet. Clin. Equine Pract.*, v. 18, p. 271–293, 2002.

JOHNSON, P. J.; MESSER, N. T.; GANJAM, V. K. Cushing's syndromes, insulin resistance and endocrinopathic laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 36, f. 3, p. 194–198, 2004.

KARIKOSKI, N. P.; PATTERSON-KANE, J. C.; ASPLIN, K. E.; et al. Morphological and cellular changes in secondary epidermal laminae in horses with insulin-induced laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 75, p. 161-168., 2014.

KARIKOSKI, N. P.; MCGOWAN, C. M.; SINGER, E. R.; et al. Pathology of natural cases of equine endocrinopathic laminitis associated with hyperinsulinemia. *Vet. Pathol.*, v. 52, p. 945-956, 2015.

KARIKOSKI, N. P.; PATTERSON-KANE, J.C.; SINGER, E.R.; et al. Lamellar pathology in horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *Equine Vet. J.*, v. 48, p. 472-478, 2016.

KELLERER, M.; SESTI, G.; SEFFER, E.; et al. Altered pattern of insulin receptor isoforms in skeletal muscle membranes of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia*, v.36, p. 628-632, 1993.

MAGALHÃES, J. F.; LIMA, I.C.R.; LIMA, L. R.; et al. Estudo da correlação de medidas radiográficas indicadoras de laminite em éguas da raça Mangalarga Marchador com e sem sinais de sobrepeso. *Aq. Bra. Med. Vet. Zoot.*, v. 66, n. 4, p. 1023 – 1032, 2014.

MARSHALL, S.; GARVEY, W.T.; GELLER, M. Primary culture of isolated adipocytes. A new model to study insulin receptor regulation and insulin action. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 6376-6384, 1984.

McGOWAN, C. M.; ASPLIN, K.; POLLITT, C.; SILENCE, M. Endocrinopathic Laminitis in Horses. *Equine Chapter Proceedings...* p. 12 – 15, 2007.

O`GRADY, Stephen E.; POUPARD, D. A. Physiological horseshoeing: an overview. *Equine Vet. Ed.*, v. 13, n. 6, p. 330-334, 2001.

ORSINI, J. A.; CLARK, K.; INGLES, J.; et al. Clinical risk factors for equine laminitis: observational findings. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 840, 2013.

PAZ, C. F. R.; PAGANELA, J. C.; dos SANTOS, C. A.; et al. Relação entre obesidade, insulina plasmática e posicionamento da falange distal em equinos da raça Crioula. *Arq. Bra. Med. Vet.*, v. 65, n. 6, p. 1699 – 1705, 2013.

POLLITT, C. C. Equine laminitis. *Clin. Techn. Equine Pract.*, v. 3, n. 1, p. 34-44, 2004.

POLLITT, C.C. *Equine Laminitis Current Concepts*. Publication N° 08/062, Project No.RIRDC UQ-118A. Queensland – Australia, 2008.p.69-74.

REDDEN, R.F. Clinical and radiographic examination of the equine foot. *Proc. American Association Equine Practitioners*, v.49, p.169-185, 2003.

SUMMERS, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progr. Lipid Res.*, v. 45, p. 42–72, 2006.

TADROS, E. M. e FRANK, N. Endocrine disorders and laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 25, iss. 3, p. 152 – 162, 2013.

THATCHER, C. D.; PLEASANT, R. S.; GEOR, R. J.; ELVINGER, F. Prevalence of overconditioning in mature horses in southwest Virginia during the summer. *J. Vet. Int. Med.*, v. 26, p. 1413-1418, 2012.

THRALL, D. E. *Textbook of veterinary diagnostic radiology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2002. p. 758.

VIEIRA, R.A.M.; CASTRO, T.C.; AZEVEDO, D.S.D. *et al.* Relação espacial entre a falange distal e o estojo córneo em equinos de elite da raça Mangalarga Marchador. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIAS*, 10., 2012, Florianópolis. *J. Bras. Cienc. Anim.*, v.5, p.643-643, 2012.

WALSH, D. M.; MCGOWAN, C. M.; MCGOWAN, T.; et al. Correlation of Plasma Insulin Concentration with Laminitis Score in a Field Study of Equine Cushing's Disease and Equine Metabolic Syndrome. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 29, n. 2, p. 87-94, 2009.

WYSE, C. A.; MCNI, E. K. A.; TANN AHILL, V. J.; et al. Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. *Vet. Rec.*, v. 162, p. 590-591, 2008.

XAVIER, V. F.; LIMA, I. R.; MARVAL, C. A. D.; et al. Estudo radiográfico do posicionamento da falange distal e suas possíveis correlações com obesidade em equinos de patrulhamento da Polícia Militar do Estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.3, p.672-680, 2014.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO LAMELAR EM EQUINOS COM OBESIDADE INDUZIDA

RESUMO

A Síndrome Metabólica Equina (SME) se caracteriza por um distúrbio metabólico associado à obesidade que predispõe os cavalos à laminite, a resistência à insulina é o ponto central da fisiopatologia dessa síndrome. A laminite decorrente da SME é designada de laminite endocrinopática tendo como característica a manifestação de claudicação leve, ou mesmo imperceptível, com demonstração de sensibilidade do casco menor ou não aparente se comparado à laminite inflamatória, contudo, invariavelmente o animal apresenta deformidades nas linhas externas de crescimento do casco e alterações radiográficas características da laminite. O objetivo deste experimento foi analisar as alterações morfológicas da parede do casco e alterações histopatológicas do tecido laminar do casco em equinos com obesidade induzida, verificando se a análise histomorfométrica do casco pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico precoce para a laminite endocrinopática. 9 equinos adultos com escore corporal (ECC) médio (\pm DP) inicial de $2,9\pm 1$ (escala de 1-9) foram submetidos a uma cobrecarga alimentar atingindo um ECC de $8,3\pm 1$ após 150 dias de experimento. Foram coletados os dados antes e após 150 dias da indução de obesidade, as amostras para a análise histopatológica foram obtidas com a realização de biópsia da parede dorsal do casco. Para a análise estatística foi utilizado o teste de t de Student ($P < 0,05$). Macroscopicamente foi constatado a presença de anéis divergentes na parede do casco em todos os animais. Microscopicamente houve redução no comprimento das lâminas epidérmicas primárias e secundárias, com concomitante aumento da ocorrência de hiperplasia da camada suprabasal nas lâminas epidérmicas secundárias. Conclui-se que equinos com obesidade induzida por um período de 150 dias desenvolveram sinais histológicos de laminite subclínica, que coincidiram com formação de anéis divergentes na parede do casco. Esses achados indicam que o uso da técnica de biópsia antes da demonstração dos sintomas pode ser uma ferramenta para diagnóstico e avaliação precoce da laminite.

Palavras Chave: Cavalos, Biópsia, Laminite, Síndrome Metabólica Equina.

ABSTRACT

*Equine Metabolic Syndrome (EMS) is characterized by a metabolic disorder associated with obesity that predisposes horses to laminitis. Insulin resistance is the focal point of the pathophysiology of this syndrome. Laminitis due to EMS is called endocrinopathic laminitis, characterized by the manifestation of mild or even imperceptible lameness, with a lower or no apparent hoof sensitivity when compared to inflammatory laminitis. However, the animal invariably presents deformities in the external lines of Hoof growth and radiographic changes characteristic of laminitis. The objective of this experiment was to analyze the morphological alterations of the hoof wall and histopathological alterations of laminar hoof tissue in horses with induced obesity, verifying if histomorphometric analysis of the hoof can be used as an early diagnostic tool for endocrinopathic laminitis. 9 adult horses with mean body (EC) mean score (\pm SD) of 2.9 ± 1 (1-9 scale) underwent a feedlot reaching an ECC of 8.3 ± 1 after 150 days of experiment. Data were collected before and after 150 days of obesity induction, the samples for the histopathological analysis were obtained with a biopsy of the dorsal wall of the hoof. Statistical analysis was performed using the Student *t* test ($P < 0.05$). Macroscopically it was found the presence of divergent rings on the hoof wall in all animals. Microscopically, there was a reduction in the length of the primary and secondary epidermal laminae, with a concomitant increase in the occurrence of suprabasal layer hyperplasia in the secondary epidermal laminae. It was concluded that horses with obesity induced by a period of 150 days developed histological signs of subclinical laminitis, which coincided with the formation of divergent rings on the hoof wall. These findings indicate that the use of the biopsy technique prior to the demonstration of symptoms may be a tool for early diagnosis and evaluation of laminitis.*

Keywords: Horse, Biopsy, Laminitis, Equine Metabolic Syndrome.

1. INTRODUÇÃO

O casco do equino pode ser descrito quanto às suas características macro e micro anatômicas, tendo em sua composição um estojo córneo conectado à falange distal por lâminas longitudinais primárias (Pollitt, 2007). Esse estojo protege as estruturas presentes em seu interior do atrito com o solo quando o animal realiza o movimento e quando está em estação (Pollitt, 2004). A proteína predominante no estojo córneo do casco é a queratina, possuindo duas consistências diferentes. A queratina dura é rica em pontes de dissulfeto, se caracterizando por sua alta resistência, a queratina mole rica em sulfidrila e pobre em pontes de dissulfeto, tendo como natureza sua maciez. A área anatômica do casco que é rica em queratina dura é a parede dorsal do casco e as porções do casco que são ricas com a queratina mole são o perioplo, a rânilha e a linha branca do casco (Pollitt, 2004).

Esse tecido queratinizado é composto por três camadas, o estrato externo, o estrato médio e o estrato interno. O estrato externo é composto pela espessa camada córnea superficial, o estrato médio é a camada de maior profundidade se distinguindo por sua estrutura tubular e por último existe o estrato interno, que possui as lâminas epidérmicas que interagem com as lâminas dérmicas dando origem ao cório laminar. Na porção mais profunda do casco é encontrado o tecido conjuntivo denso e colagenoso, rico em vascularização e inervação, denominado de cório, também conhecido como derme. A derme reveste todo o perióstio da terceira falange e está fortemente aderido às lâminas epidérmicas (Stashak, 1996, Céleste e Szoke, 2005).

A análise histológica descritiva do tecido lamelar em equinos com laminite tem a finalidade de determinar suas possíveis causas, seu estágio evolutivo e progressão, tornando benéfico a habilidade de examinar esse tecido através desse método (Stokes, 2003). Vários estudos têm sido realizados no sentido de caracterizar as lesões lamelares promovidas pelo mecanismo endocrinopático utilizando animais submetidos ao modelo de hiperinsulinemia com normoglicemia (Asplin, 2010, de Laat et al., 2011) ou equinos com casos clínicos avançados (Karikoski et al., 2014).

Já está bem estabelecido que, em contraste com as lesões observadas nas laminite inflamatórias, as laminites endocrinopáticas não demonstram desintegração generalizada da membrana basal. Na laminite séptica com origem experimental observa-se aumento da atividade mitótica, sinais de apoptose epidérmica e baixa infiltração neutrofílica (Asplin, 2010, de Laat et al., 2011). Já a laminite endocrinopática crônica de origem natural apresenta alterações características de fusão da porção abaxial das lâminas primárias, disqueratose, hiperplasia epidérmica, aumento da apoptose e elevação da separação lamelar, na porção axial das lamelas primárias epidérmicas demonstram perfil de alongamento e um aumento da atividade mitótica (Karikoski et al., 2014, Karikoski et al., 2016).

Apesar deste conhecimento, ainda não existem estudos sobre a análise histológica das fases inicial, de desenvolvimento, da laminite endocrinopática natural. Assim, o objetivo deste experimento foi avaliar, por meio de análise histopatológica, as alterações no tecido lamelar do casco e as alterações da parede do casco em equinos com obesidade induzida e verificar se a análise histopatológica pode ser uma ferramenta viável para o diagnóstico precoce da laminite endocrinopática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 9 animais submetidos a brecarga alimentar, conforme descrito no Capítulo 2. Para avaliação das características histológicas do tecido lamelar do casco foram realizadas duas biópsias. Uma antes e outra ao final do período experimental.

2.1. COLETA DA BIÓPSIA

Para o procedimento de biópsia do tecido lamelar do casco foi utilizado o instrumento cirúrgico denominado lamelótomo de Falcão-Faleiros (Ribeiro et al., 2017). Após um período de jejum prévio alimentar sólido e hídrico de 12 e 6 horas respectivamente, os equinos foram sedados com a associação de cloridrato de xilazina a 10% (0,25 mg/kg) e acepromazina a 1,0% (0,03 mg/kg) por via IV. Para a dessensibilização dos cascos torácicos foi realizado o bloqueio dos nervos digitais palmares lateral e medial na região dos ossos sesamóides proximais com o uso de cloridrato de lidocaína a 2%, no volume de 3 ml em cada ponto de administração.

Após antissepsia da muralha, uma área de 4x1 cm foi demarcada na porção mais dorsal da parede do casco a uma distância de 3 cm distal à borda coronária. A seguir, o tecido córneo dessa área foi desbastado utilizando-se um escariador chato de 9,5 mm de diâmetro, previamente autoclavado, que foi acoplado a uma microrretífica (Dremel Série 300). O tecido foi desbastado sem atingir o extrato lamelar, até o ponto em que o tecido córneo se tornasse flexível quando pressionado por uma pinça hemostática Kelly. Neste momento, um garrote foi aplicado acima da

região do boleto, com o intuito de reduzir a hemorragia durante a realização da extração da amostra da biópsia.

A partir deste ponto, o tecido lamelar foi incidido nos limites internos da área desbastada. Para tanto, utilizou-se um bisturi número 22 montado em cabo 4, que avançou de forma perpendicular à fina camada de tecido córneo, passando pelo extrato lamelar, até atingir a derme profunda. O lamelótomo foi então posicionado de forma perpendicular na borda lateral da incisão e pressionado no sentido axial até a derme profunda, sendo realizado o avanço paralelamente à falange distal até atingir o limite medial da área desbastada, permitindo assim a apreensão e a extração da amostra tecidual.

As dimensões das amostras foram obtidas e registradas com auxílio de um paquímetro. Um fragmento correspondente a um terço da amostra foi imediatamente imergido em formalina 10% tamponada, para futura análise histopatológica.

Os equinos receberam uma dose de soro antitetânico (5.000 UI/kg, SC), fenilbutazona (2,2 mg/kg, IV, 24/24h) durante 3 dias e sulfá (10 mg/kg, IV, 24/24h) durante 5 dias. Após remoção do coágulo com soro fisiológico, o local da biópsia foi obliterado com resina autopolimerizável de metilmetacrilato e o casco foi envolvido com atadura de crepom. O curativo foi trocado com um intervalo de 3 dias por um período de 10 dias, utilizando-se uma solução de clorexidina a 0,2% para a limpeza da ferida.

As coletas realizadas no período inicial foram realizadas no membro torácico esquerdo e após 150 dias as coletas foram executadas no membro torácico direito, tentando assim, eliminar o efeito do procedimento cirúrgico nas amostras.

2.2. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

48 horas após imersão em formalina, as amostras foram desidratadas em álcool e processadas de forma rotineira para inclusão em parafina. Em seguida as amostras foram seccionadas transversalmente no micrótomo. Os cortes de aproximadamente 5 a 7 micrometros de espessura foram alocados nas lâminas de vidro lapidada, sendo corados com hematoxilina – eosina (HE) e com o corante ácido periódico-Schiff (PAS) para a observação da integridade das lâminas dérmicas, epidérmicas e das células basais. As lâminas foram confeccionadas no laboratório de apoptose localizado no departamento de patologia geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) pertencente à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para avaliação histológica foi utilizado o software Panoramic Viewer 2.0 for Windows (3D Histech kft., Budapeste, Hungria) que permite trabalhar com as imagens digitalizadas a partir das lâminas escaneadas pelo microscópio digital (3D Histech® localizado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) situado no ICB pertencente ao campus da Universidade Federal de Minas Gerais.

Utilizando a metodologia empregada por Kariokoski e colaboradores (2014) foi realizada a análise de histomorfometria e a categorização das lâminas descritas a seguir.

Para análise das lâminas epidermais primárias (LEP) foi utilizado aumento de 40x, para a análise das lâminas epidermais secundárias (LES) foi utilizado o aumento de 200x de magnificação. As LEP foram divididas em três porções (Fig. 9), distribuídas em região abaxial, correspondente à

10% da lâmina primária (próximo ao tecido queratinizado do casco), região intermédia correspondente a 50% da extensão da lâmina primária analisada e a região axial correspondendo pelos 40% finais do comprimento da lâmina primária (porção próxima ao tecido periostal da falange distal).

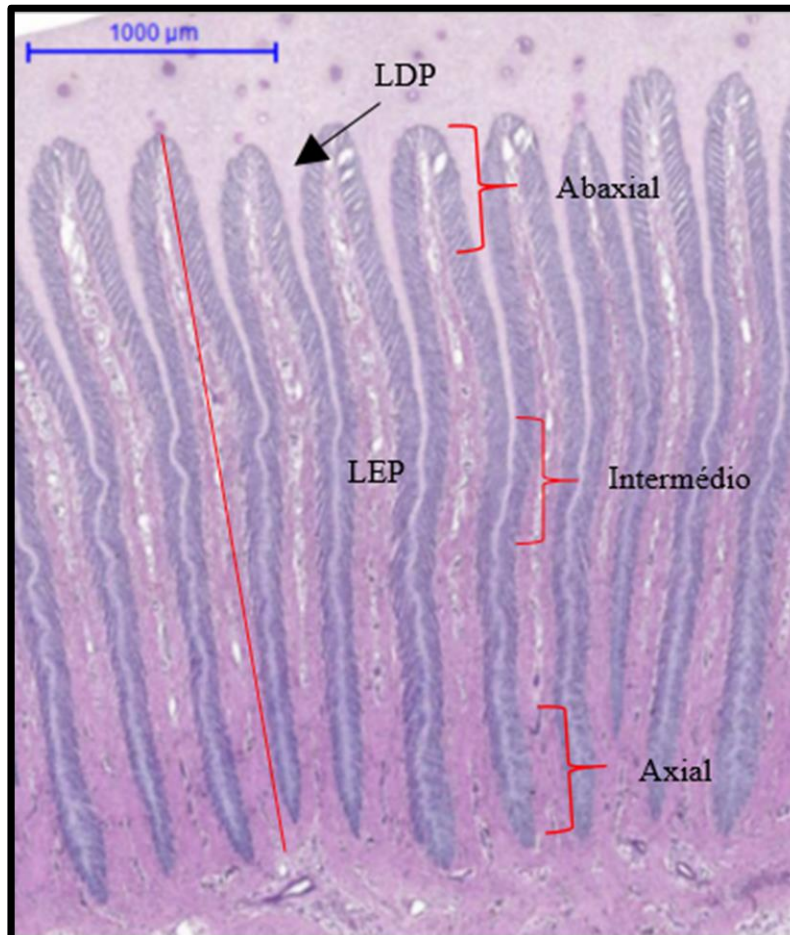


Figura 9: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), através do aumento 2x. Demonstração da técnica utilizada para a mensuração do comprimento das LEP e as divisões utilizadas para a análise histomorfométrica e sua categorização, seguindo a metodologia utilizada por Karikoski et al., 2014 . LEP: Lâmina epidermal primária, LDP: Lâmina dérmica primária

Para determinar quais LEPs seriam estudadas, todas as lâminas primárias presentes no corte foram numeradas. Em seguida foi utilizado a ferramenta de seleção aleatória do site <http://www.randomizer.org/form.html>, onde foram selecionados 10 LEPs ao acaso. Para a determinação de quais LESs seriam analisadas, as lâminas secundárias presentes nas 10 lâminas primárias selecionadas anteriormente, foram numeradas e selecionados aleatoriamente através do uso da mesma ferramenta de seleção aleatória para a determinação das LEPs, elegendo 5 lâminas secundárias da superfície esquerda e 5 lâminas secundárias da superfície direita, distribuídas em cada região das LEP (abaxial, intermédia e axial), totalizando 30 LES.

As LEPs foram mensuradas e classificadas quanto ao seu comprimento e seu formato com as seguintes características, padrão (reto), curvado (com 2 ou mais curvas) e com bifurcações (Figura 10).



Figura 10: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), através do aumento 2x. Demonstração da técnica utilizada para a mensuração as características morfológicas das LEP, 1: padrão (reto), seta demonstrando o sinal de uma curva, 2: LEP com uma bifurcação, seguindo a metodologia utilizada por Karikoski et al., 2014.

A região abaxial da LEP foi analisada respeitando suas propriedades, como padrão, cônico, afiado e bifurcado (Figura 11).

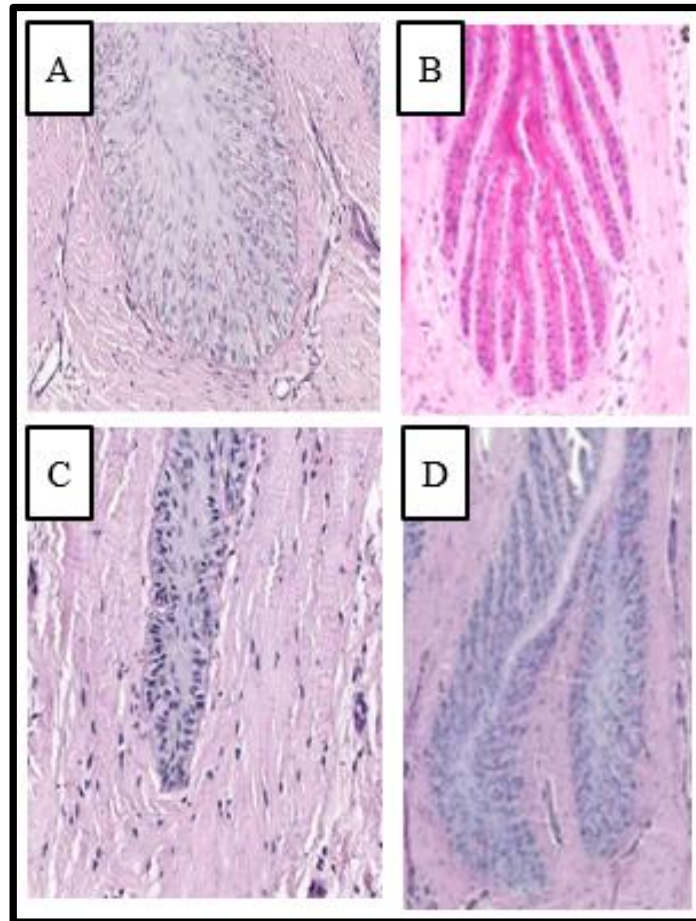


Figura 11: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstrando a técnica utilizada para a análise morfológica da região abaxial da LEP, A: padrão, B: cônico, C: afiado, D: bifurcado, imagem modificada de Karikoski et al., 2014.

Conforme demonstrado na Figura 12, a região axial de cada lâmina epidérmica primária foi analisada observando as seguintes variáveis, padrão, afiado, bifurcado, com característica proliferativa (células disqueratóticas ligadas ao tecido dérmico), separadas (com lise da junção das células epidérmicas com as lâminas dérmicas) e queratinizado.

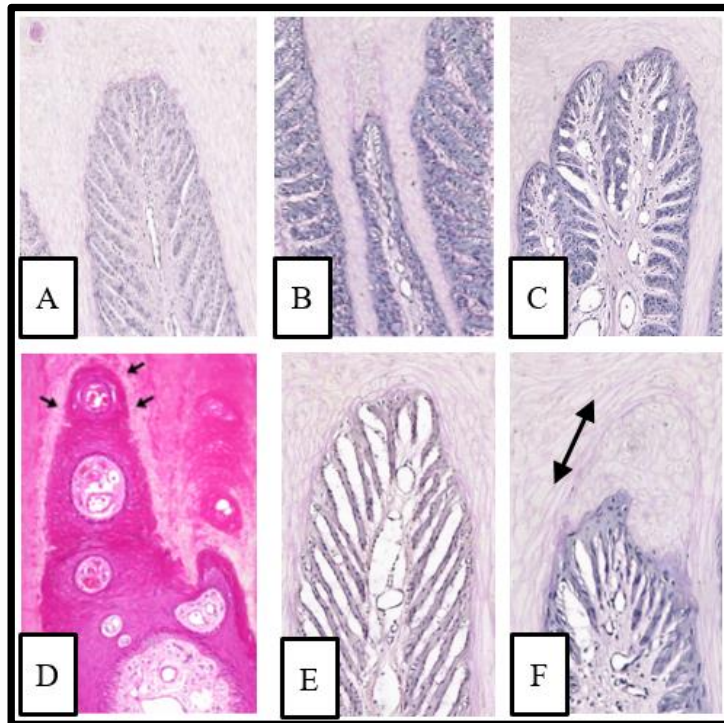


Figura 12: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas, demonstração a técnica utilizada para análise morfológica da região axial da LEP, A: padrão, B:afiado, C: bifurcado, D: separada, E: proliferativa, F: queratinizado, imagem modificada de Karikoski et al., 2014.

O grau de queratiniza o da região axial foi classificado como normal, ligeiramente aumentada (1-10 camadas extras), moderadamente aumentado (10-30 camadas extras) e aumento acentuado (> 30 camadas) e também foi mensurado o seu comprimento (Figura 13).

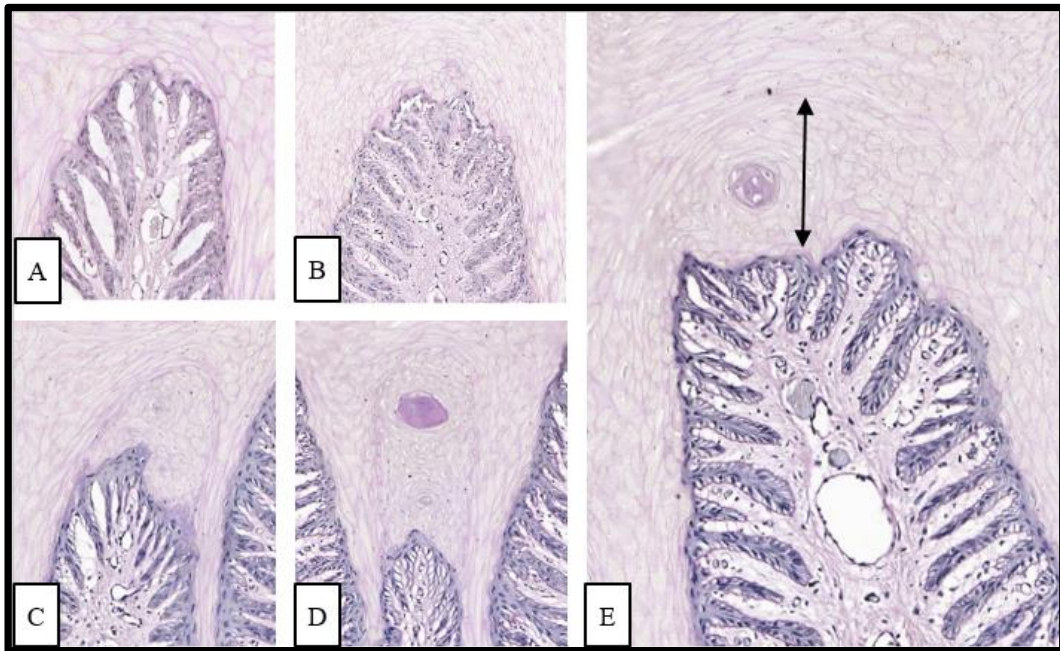


Figura 13: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstrando a técnica utilizada para análise do grau de queratinização da região abaxial da LEP. A: normal, B: ligeiramente aumentado, C: moderadamente aumentado, D: aumento acentuado, E: técnica utilizada para mensurar o comprimento da queratinização da LEP, seguindo a metodologia utilizada por Karikoski et al., 2014.

Outras variáveis observadas nas LEPs foram a quantidade de tecido epidérmico em ponte com a lâmina dérmica primária (LDP) em sua porção axial, com as seguintes peculiaridades, nenhuma, leve (1 a 2 pontes epiteliais), moderado (> 2 pontes epiteliais) e extensa (região completamente preenchida com células epidérmicas). Foram analisadas a presença de ilhas epiteliais, definindo elas como estruturas epiteliais redondas ou ovóides que se encontravam isoladas, nas três regiões das LEP e caracterizadas como redondas, sólidas, estruturas epiteliais ovóides e sua ausência.

As lâminas epidérmicas secundárias foram avaliadas quanto ao seu comprimento e sua conformação, com as seguintes classificações, padrão, cônico, em forma de clava, hiperplasia da camada suprabasal (HCS), bifurcada, fundida, separada e queratinizada (Figura 14).

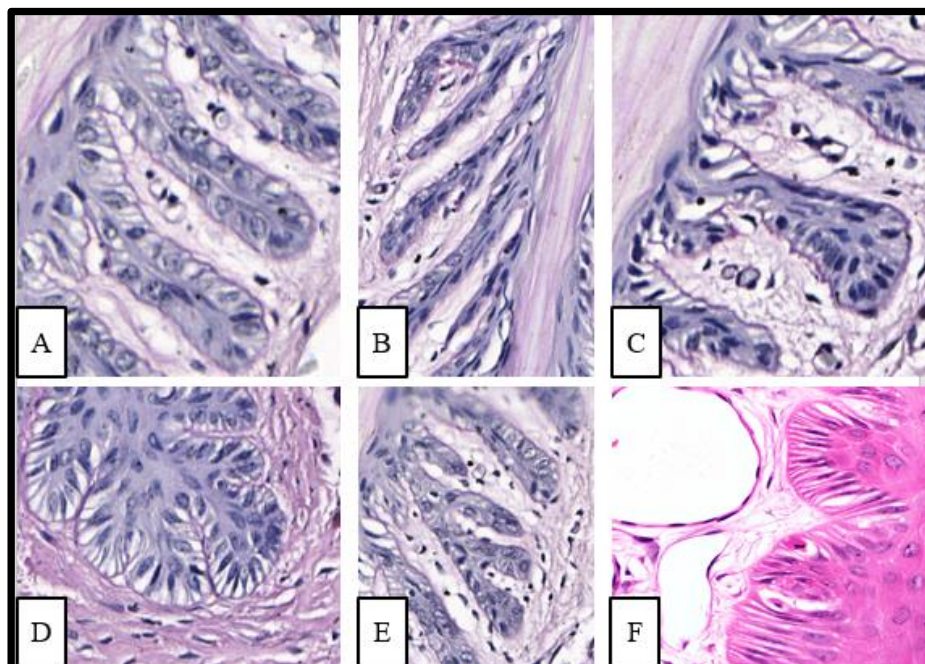


Figura 14: Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas primárias utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstração a técnica utilizada para análise das características morfológicas da LES. A: padrão, B: cônico, C: clava, D: hiperplasia da camada suprabasal (HCS), E: bifurcado, F: fundida, imagem modificada de Karikoski et al., 2014.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ocorrência de cada uma das características estudadas foi analisada por meio da compara o entre o número de LEP (em suas porões axial, intermédia e abaxial) e de SEL antes e após a indu o da obesidade. Para essa análise e para medidas morfométricas utilizou-se o teste t-Student pareado utilizando a plataforma da MS-Excel 2016. Para a compara o das variáveis não paramétricas foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon. Foi considerado o nível de significância de $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

Em rela o   avalia o integral das LEP (Tabela 14), observou-se altera o em seu comprimento total, que apresentou uma redu o média de 9%. Entretanto, não se observaram diferenças na ocorrência dos formatos padrão ($P = 1$), curvo ($P = 0,93$) e bifurcado ($P = 0,48$) ante e após a indu o da obesidade.

Tabela 14: Médias e desvios-padrão do comprimento e da ocorrência (1 a 10) de diferentes formatos das lâminas epidermais primárias de equinos, antes e após indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$.

	Inicial		Final		Valor de P
	Média	DP	Média	DP	
Padrão	6,50	2,35	6,50	2,06	1,000
Curvo	1,75	2,46	1,88	1,99	0,933
Bifurcações	2,00	1,50	1,55	1,23	0,480
Comprimento (μm)	2903,95	323,53	2643,28	307,09	0,029

Na avaliação da porção abaxial das LEPs (Tabela 15), não foi observado diferença significativa entre os grupos em relação às ocorrências dos formatos padrão ($P = 0,57$), afiado ($P = 0,59$), bifurcado ($P = 0,62$), separadas ($P = 0,65$) e queratinizadas ($P = 1$). No entanto a ocorrência das LEP do tipo proliferativa apresentou um valor de P de 0,069. Por outro lado, a porção axial das LEPs (Tabela 16) demonstraram diferenças com as lâminas em formato padrão ($P = 0,023$). Já as formações cônico e bifurcado não apresentaram valor significativo com os respectivos valores de P de 0,191 e 0,225.

Tabela 15: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes formatos da porção abaxial das lâminas epidermais primárias de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$.

	Inicial		Final		Valor de P
	Média	DP	Média	DP	
Padrão	3,00	2,92	4,11	3,33	0,577
Afiado	0,78	1,30	1,00	0,87	0,594
Bifurcada	0,56	0,53	0,78	1,20	0,622
Proliferativa	1,33	1,00	0,44	0,73	0,069
Separadas	4,22	4,41	3,22	3,07	0,659
Queratinizadas	0,89	1,69	0,89	1,17	1,000

Tabela 16: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes formatos da porção axial das lâminas epidermais primárias de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$.

	Inicial		Final		Valor de P
	Média	DP	Média	DP	
Padrão	4,33	3,61	1,44	2,01	0,023
Cônico	2,44	2,19	4,11	2,03	0,191
Afiado	1,89	1,36	4,00	2,69	0,069
Bifurcado	1,33	1,58	0,44	0,73	0,225

As variáveis quantidade de tecido epidérmico em ponte com a lâmina dérmica primária (LDP) em sua porção axial, a presença de ilhas epiteliais e o grau de queratinização da região axial não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados neste experimento (Tabelas 17, 18 e 19).

Tabela 17: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes classificações do de tecido epidérmico em ponte com a lâmina dérmica primária (LDP) em sua porção axial de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$.

	Incial		Final		Valor de P
	Média	DP	Média	DP	
Nenhum	0	0	0	0	0
Leve	6,18	1,28	5,63	2,81	0,510
Moderada	1,41	0,88	1,66	0,85	0,578

Tabela 18: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes classificações do tipo de ilhas epiteliais nas lâminas dérmicas primárias (LDP) em sua porção axial de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$.

	Incial		Final		Valor de P
	Média	DP	Média	DP	
Redondas	0,11	0,33	0	0	0,35
Sólidas	0,33	0,50	0,75	0,87	0,20
Estruturas Epiteliais Ovoides	0,89	0,93	1,00	0,93	1,00
Ausentes	8,67	1,00	7,00	2,92	0,14

Tabela 19: Médias e desvios-padrão da ocorrência (1 a 10) de diferentes graus de queratinização da região axial nas lâminas dérmicas primárias (LDP) de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$.

	Incial		Final		Valor de P
	Média	DP	Média	DP	
Normal	5,44	2,96	3,44	2,46	0,144
Ligeiramente aumentado	3,00	2,00	3,89	1,62	0,362
Moderadamente aumentado	1,44	1,42	2,56	1,51	0,139
Acentuadamente aumentado	0,11	0,33	0,11	0,33	1,000
Comprimento (μm)	59,15	24,17	75,68	24,00	0,211

Os resultados obtidos na análise das lâminas epidérmicas secundárias (LES) estão representados na Tabela 20. Nas três regiões das LEPs houve diferença estatística no formato padrão e na hiperplasia da camada suprabasal (HCS). Em contrapartida as LES queratinizadas não apresentaram valores significativos entre os grupos. A LES com a característica morfológica separados não foi observado em nenhum momento do experimento. A forma em clava apresentou valor significativo na comparação entre os grupos apenas na porção abaxial das LEP ($P = 0,028$).

Já em relação ao comprimento das LES, verificou-se redução significativa de sua mensuração nas porções axial e intermédia com seus respectivos de $P = 0,01$ e $P = 0,022$. Enquanto que a alteração de seu comprimento na porção abaxial não foi significativa ($P = 0,16$).

Tabela 20: Médias e desvios-padrão do comprimento e da ocorrência (1 a 10) de diferentes formatos das lâminas epidérmicas secundárias, nas porções axial, intermédia e axial das lâminas primárias, de equinos, antes e após a indução da obesidade por um período de 150 dias, $P \leq 0,05$.

Grupos		Padrão	Cônico	Clava	HCS	Bifurcado	Fundidos	Separados	Queratinizados	Comp. (μm)
Axial										
Inicial	Média	5,78	3,56	0,11	0	0,56	0	0	0	163,68
	DP	4,12	3,75	0,33	0	0,73	0	0	0	46,34
Final	Média	1,67*	2,67	0,11	3,44*	2,33*	0,33	0	0,78	117,81*
	DP	1,58	3,16	0,33	3,36	2,00	0,50	0	2,33	27,08
Intermédio										
Inicial	Média	3,78	3,56	1,11	1,11	0,44	0	0	0	175,60
	DP	3,15	2,96	1,76	1,45	0,73	0	0	0	63,50
Final	Média	0,33*	2,22	2,00	4,67**	1,89*	0	0	0,11	116,02*
	DP	0,50	2,86	2,29	2,96	1,76	0	0	0,33	35,36
Abaxial										
Inicial	Média	3,78	0,44	3,33	0,78	1,44	0,22	0	0	114,96
	DP	2,54	0,73	1,87	1,30	2,01	0,44	0	0	70,46
Final	Média	0,63**	0,89	1,22*	6,00***	2,11	0,67	0	0	83,57
	DP	0,74	0,60	1,48	1,66	2,26	1,12	0	0	27,01

Teste de Tukey, [§] teste de Friedman, valor de P significativo $\leq 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que houve alteração no tecido laminar dos cascos dos equinos após 150 dias indução da obesidade. A alteração mais marcante foi a redução no comprimento tanto das LEP quanto das LES, coincidente com um aumento de ocorrência de hiperplasia da camada subabasal das LES. Ressalta-se que, apesar de linhas divergentes na muralha do casco terem sido observadas ao final do experimento, nenhum dos animais apresentou sintomatologia clínica característica da laminite. Tal fato permite a interpretação de que as alterações observadas representam a fase de desenvolvimento ou prodromal da laminite endocrinopática.

O fato das lâminas epidermais primárias e secundárias apresentarem redução significativa de seu comprimento foi curioso, uma vez que estudos anteriores com hiperinsulinemia (de Laat et al 2011, de Laat et al. 2013) ou hiperglicemia (de Laat et al 2012) induzidas ou mesmo com casos naturais de laminite em equinos com síndrome metabólica (Karikoski et al 2014) ou disfunção da parte intermédia da hipófise (Karikoski et al 2016) demonstraram aumento dessas variáveis.

Karikoski et al., (2016) associaram o crescimento das LEP e LES com o aumento da quantidade de queratina, essa alteração necessita de um longo período de tempo para se desenvolver, lembrando que o trabalho desses autores analisou casos naturais de laminite endocrinopática, e o aumento foi observado em animais com laminite sintomática, diferindo desse experimento. Talvez a explicação para essa discrepância seja pelo curto período em que o presente experimento foi realizado, não sendo longo o bastante para que os animais desenvolvessem essa alteração. Um sinal que pode confirmar essa teoria é o fato de que os animais não apresentaram sintomatologia clínica de laminite. O grau de queratinização da região axial das LEPs não foi significativo ($P = 0,21$), mas foi notado um aumento médio do comprimento de 27,94% nas amostras obtidas na coleta realizada ao final de experimento quando comparado à coleta inicial, essa alteração poderia ser um indício das alterações observadas em Karikoski et al., (2016).

Em relação ao aumento no comprimento das LEP e LES verificado nos casos de hiperinsulinemia induzida e que se desenvolvem em um espaço curto de tempo (6 a 72 horas) vale ressaltar que nesses modelos os níveis de insulina plasmática atingem em torno de 1000 $\mu\text{UI/L}$ (de Laat e al 2011; de Laat et al 2013), ou seja, concentrações 50 vezes superiores às concentrações basais e 20 vezes superiores ao pico induzido pelo teste dinâmico de glicose oral que foram verificados no presente estudo (Capítulo 2). Considerando-se que casos naturais de laminite em equinos com obesidade podem demorar anos para se desenvolver, o encurtamento das lâminas epidermais primárias e secundárias parece ser o primeiro estágio de desenvolvimento da doença, que culmina com um posterior alongamento associado ao início de sinais clínicos.

A porção axial das LEPs não apresentou alterações morfológicas entre as duas coletas, sendo observada apenas uma redução não estatística na quantidade das lâminas com característica proliferativa ($P=0,069$). Isto diverge do trabalho de Karikoski et al., (2015), onde os autores observaram um aumento das alterações de fusão, queratinização e separação das porções abaxial das LEPs em equinos com DPPI com sinais clínicos de laminite. Por outro lado essa indistinção entre os grupos confirma o resultado observado por Karikoski et al., (2016) que não observaram diferença entre seus grupos analisados.

A região abaxial das LEPs apresentou uma diminuição de 33,25%, na quantidade das lâminas primárias com formato padrão entre as coletas ($P = 0,023$). A quantidade de lâminas com formato afiado também foi elevada na coleta final, ficando próximo da significância ($P = 0,069$). Esses resultados estão de acordo com diversos trabalhos publicados que relatam o afinamento das LEP na porção axial em animais com ocorrência natural de laminite endocrinopática (Karikoski et al., 2014, Karikoski et al., 2015, Karikoski et al., 2016).

Nesse experimento não foram observadas alterações significativas nas variáveis analisadas do tecido epidérmico em ponte com a lâmina dérmica primária (LDP) e presença de ilhas epiteliais nas LEP concordando com os resultados obtidos na análise realizada por Karikoski et al., (2016).

As lâminas epidermais secundárias com formato padrão analisadas na coleta final apresentaram diminuição de sua ocorrência e foi contemplado um aumento na quantidade de lâminas com o formato HCS nas três regiões analisadas. O formato de clava apresentou elevação apenas na região axial e a característica bifurcada foi constatada apenas na região abaxial. Esse experimento demonstrou menos alterações se comparado aos resultados observados no experimento de Karikoski et al., (2016) que testemunharam uma diminuição na quantidade de LES com formato padrão e um aumento das lâminas fundidas nas três regiões, um aumento no formato cônico, diminuição do formato em clava nas regiões abaxial e intermédia, um aumento na quantidade de lâminas em formato HCS nas regiões axial e abaxial e uma diminuição das lâminas com formato bifurcado na região abaxial.

As alterações observadas do tecido laminar decorrentes de laminite séptica têm sido correlacionadas a lesões mais extensas e de maior gravidade quando comparado às lesões originárias de alterações endocrinológicas. Tais lesões se apresentam com uma maior degradação da membrana basal, com uma lesão característica de “luva” onde as lamelas epidérmicas se separam das dérmicas, sugerindo que essas lesões são características exclusivas agudas, relacionada ao processo inflamatório sistêmico, se diferenciando dos casos causados pela síndrome metabólica (Morgan et al., 2003).

Mas, por outro lado, nem todos os modelos de laminite séptica ocasionaram ruptura da membrana basal, apresentando apenas a degeneração vacuolar e morte das células epidérmicas em suas regiões abaxiais. Embora os danos do tecido lamelar na laminite endocrinopática podem se desenvolver mais lentamente, tem sido observado que as lesões apresentadas nesta laminite se localizam também na porção abaxial, concordando com os resultados observados no presente experimento, também foi constatado lesões nas outras duas regiões analisadas, na porção intermédia e axial (Morgan et al., 2003).

Estas lesões presentes no tecido laminar podem muitas vezes estar relacionadas à vários fatores com a alterações distribuídas nas três regiões do tecido laminar, ente esses fatores temos a distribuição das forças biomecânicas que podem ocasionar alterações subsequentes à região intermédia e axial. Outra teoria seria devido a maiores distâncias do abastecimento vascular das células lamelares na porção abaxial. Esse distanciamento do suporte sanguíneo foi anteriormente sugerido como uma das causas de uma maior demanda de toxinas e citocinas, aumentando assim a sensibilidade metabólica das células abaxiais (Thomason et al., 2005).

As maiores ocorrências de alterações na porção abaxial do tecido LEP aqui também relatadas podem estar correlacionadas com a menor expressão da p63 nas células epidérmicas presentes nessa região. A p63 é uma proteína que desempenha um papel fundamental na regulação da

proliferação epitelial e sua diferenciação. Essa característica também foi observada pelo aumento das alterações das LES localizadas na porção abaxial, com maior quantidade de lâminas secundárias com os formatos fundidos, bifurcados, com hiperplasia da camada suprabasal e diminuição das formas consideradas padrão, demonstrando assim uma maior atividade celular, concordando com os trabalhos de Donaldson et al., (2004) e de Laat et al., (2012) que também observaram uma maior atividade celular na porção abaxial (Carter et al., 2009)

Esse comportamento do tecido lamelar secundário também foi observado no trabalho elaborado por Karikoski e colaboradores (2014), onde foi constatado um maior ciclo celular com alterações morfológicas dessas lâminas na fase aguda da laminite hiperinsulinêmica, e esse comprometimento da região abaxial pode desencadear desequilíbrios biomecânicos com implicações na região intermédia e axial das LEP.

Também é importante salientar que as coletas realizadas no momento inicial apresentaram algumas características inesperadas, tais como a presença de algumas LEP com bifurcações ou alterações morfológicas da porção abaxial das LEP com características proliferativas, separadas e queratinizadas, e na porção axial com formatos cônicos e bifurcado e um processo de queratinização. Essas alterações inesperadas também foram observadas quando as LES apresentaram a presença de lâminas em formato cônico, em clava, HCS e bifurcações, essas alterações também foram observadas no experimento de Karikoski et al., (2014), onde o grupo controle também não apresentavam evidências de possíveis alterações.

Karikoski et al., (2014) ressaltam que apesar de alterações maiores não serem observadas no tecido lamelar de equinos controle, não é possível excluir outras causas iniciadoras de pequenos danos no epitélio lamelar, incluindo um comprometimento mecânico. A existência de alterações no tecido lamelar de um equino que não apresenta nenhum sinal macroscópico de laminite, permite pensar que o diagnóstico de laminite está além de nossos conhecimentos atuais.

As características das lesões do tecido lamelar observadas neste experimento são indicadores de que os animais se encontravam em uma fase subclínica (prodromal) da laminite endocrinopática. Em outros trabalhos, em que foram analisadas as alterações histológicas do tecido lamelar de equinos com laminite endocrinopática natural, não foi possível correlacionar a gravidade das lesões com duração da doença clínica. Sendo teorizado que essa falta de correlação pode ser responsabilizada devido à característica dessa doença, de não se demonstrar de maneira tão dolorosa, sendo custoso para o proprietário perceber o desconforto do animal, podendo ser proposto que um animal pode apresentar mais de um quadro subclínico antes de uma apresentação clínica aguda (Morgan et al., 2015, Kawasako et al., 2009).

Mesmo que os proprietários tenham dificuldade de observar sinais de dor e claudicação, esse experimento demonstrou que alterações macroscópicas do casco também podem ser utilizadas para notar se um animal apresenta sinais de laminite endocrinopática. Lembrando que todos os animais do experimento formaram anéis divergentes e não concêntricos, se diferenciando dos anéis considerados de crescimento, pois eles são sempre concêntricos e observados em animais saudáveis (Eustace, 2010). O tempo para que os anéis divergentes se desenvolverem e serem perceptíveis é de aproximadamente 3 meses, ocorrendo após a modificação do crescimento da parede dorsal do casco. Se a exposição dos anéis divergentes ocorrerem antes dos sinais clínicos claros da laminite, sua observação pode ser uma ferramenta para um diagnóstico precoce, podendo assim adotar estratégias clínicas para tentar reverter ou retardar as alterações lamelares

causadas pela SME, as formações dos anéis divergentes também foram observadas nos experimentos realizados por Karikoski et al., (2014) e Karikoski e colaboradores (2016).

5. CONCLUSÃO

Equinos com obesidade induzida em um período de 150 dias desenvolveram sinais histológicos compatíveis com laminite subclínica, que coincidiram com formação de anéis divergentes na parede do casco. Esses achados indicam que o uso da técnica de biopsia antes da demonstração dos sintomas pode ser uma ferramenta para diagnóstico e avaliação precoce da laminite em equinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASPLIN, K. E.; PATTERSON-KANE, J. C.; SILLENCE, M. N.; et al. Histopathology of insulin-induced laminitis in ponies. *Equine Vet. J.*, v. 42, p. 700-706, 2010.

CARTER, R. A.; TREIBER, K. H.; GEOR, R. J.; et al. Prediction of incipient pasture-associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies. *Equine Vet. J.*, v. 41, n. 2, p.171–178, 2009.

CÉLESTE, C. J.; SZÖKE, M. O. Management of equine hoof injuries. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, v. 21, n. 1, p. 167-190, 2005.

de LAAT, M. A.; VAN EPS, A. W.; MCGOWAN, C. M.; et al. Equine laminitis: comparative histopathology 48 hours after experimental induction with insulin or alimentary oligofructose in Standardbred horses. *J. Comp. Pathol.*, v.145, n. 4,p. 399–409, 2011.

de LAAT, M. A.; SILLENCE, M. N.; MCGOWAN, C. M.; et al. Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinemia and lamellar histopathology in Standardbred horses. *Vet. J.*, v. 91, n. 3, p. 317–322, 2012.

de LAAT, M. A.; POLLITT, C. C.; KYAW-TANNER, M. T.; et al. A potential role for lamellar insulin-like growth factor-1 receptor in the pathogenesis of hyperinsulinaemic laminitis. *The Vet. J.* v. 197, p. 302-306, 2013.

DONALDSON, M. T.; JORGENSEN, A. J.; BEECH, J. Evaluation of suspected pituitary pars intermedia dysfunction in horses with laminitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 224, n. 7, p.1123–1127, 2004.

EUSTACE, R. A. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of chronic laminitis in Europe. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.*, v.26,n. 2, p. 391–405, 2010.

KARIKOSKI, N. P.; MCGOWAN, C. M.; SINGER, E. R.; et al. (2015) Pathology of natural cases of equine endocrinopathic laminitis associated with hyperinsulinemia. *Vet. Pathol.*, v. 52, p. 945-956, 2012.

- KARIKOSKI, N. P.; PATTERSON-KANE, J. C.; ASPLIN, K. E.; et al. Morphological and cellular changes in secondary epidermal laminae in horses with insulin-induced laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 75, p. 161-168., 2014.
- KARIKOSKI, N. P.; MCGOWAN, C. M.; SINGER, E. R.; et al. Pathology of natural cases of equine endocrinopathic laminitis associated with hyperinsulinemia. *Vet. Pathol.*, v. 52, p. 945-956, 2015.
- KARIKOSKI, N. P.; PATTERSON-KANE, J.C.; SINGER, E.R.; et al. Lamellar pathology in horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *Equine Vet. J.*, v. 48, p. 472-478, 2016.
- KAWASAKO, K.; HIGASHI, T.; NAKAJI, Y.; et al. Histologic evaluation of the diversity of epidermal laminae in hooves of horses without clinical signs of laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 70, n. 2, p. 186–193, 2009.
- MORGAN, S. J.; HOOD, D. M.; WAGNER, I. P.; et al. Submural histopathologic changes attributable to peracute laminitis in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 64, n. 7, p. 829–834, 2003.
- MORGAN, R.; KEEN, J.; MCGOWAN, C. Equine Metabolic Syndrome. *Vet. Record.*, v. 15, p. 173 – 179, 2015.
- POLLITT, C. C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 28, p. 38-46, 1996.
- POLLITT, C. C. Equine laminitis. *Clin. Techn. Equine Pract.*, v. 3, n. 1, p. 34-44, 2004.
- POLLITT, C.C. Conferência Anual da ABRAVEQ, São Paulo. The horse's foot – the inside story. São Paulo, ABRAVEQ, 2007, 29 p.
- RIBEIRO, R. M.; MENDES, H. M. F.; VALADARES, R.; et al. A novel equine hoof lamellar tissue biopsy technique. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 49, p. 63 -68, 2017.
- STASHAK, T. S. *Horseowner's Guide to Lameness*. 1st ed. CANN, C. C.; HUNSBERGER, S.; CARLEY, P. J.; MAGEE, R. D. Philadelphia, USA: Lea and Febiger, 1996. 85-120p.
- STOKES, A.M. In vitro responses of palmar digital vessel rings from horses with naturally-acquired laminitis to endothelin-1. 2003. 303 f. Tese (Doutorado) - Baton Rouge: Louisiana State University, School of Veterinary Medicine.
- THOMASON, J. J.; McCLINCHEY, H. L.; FARAMARZI, B.; et al. Mechanical behaviour and quantitative morphology of the equine laminar junction. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, v. 283, n. 2, p. 366–379, 2005.

CAPÍTULO 5

CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS DE ADIPOSIDADE, BIOMARCADORES DE DISFUNÇÃO METABÓLICA E PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS DO TECIDO LAMELAR EM EQUINOS COM OBESIDADE INDUZIDA

RESUMO

A Síndrome Metabólica Equina (SME) se caracteriza pela associação de disfunções como a obesidade e a resistência à insulina. O termo SME tem sido proposto para cavalos cujos resultados do exame clínico sugerem um risco maior para o desenvolvimento de laminite, esse termo foi adotado devido a sua semelhança com a Síndrome Metabólica em Humanos que é um conjunto de fatores de risco utilizados para prever a ocorrência de doença arterial coronariana e diabetes mellitus tipo 2 em humanos. O objetivo do presente estudo foi averiguar a existência de uma possível correlação entre os parâmetros de adiposidade, biomarcadores de disfunção metabólica e parâmetros histopatológicos do tecido lamelar de equinos com obesidade induzida e tentar identificar possíveis métodos de diagnóstico precoce para a SME. Foram utilizados 9 equinos adultos, 4 machos castrados e 5 fêmeas, que sofreram a indução de obesidade, para analisar as variáveis plasmáticas foram coletadas amostras de sangue venosa da jugular para a mensuração dos valores plasmáticos de HDL-c, LDL-c, VLDL-c, AGNE, frutamina (FRUT), glicose (GLI), colesterol (COL) e triglicérides (TRIG), para a avaliação da condição corporal dos animais foi mensurada o peso dos animais, o escore corporal através do uso da metodologia de Henneke et al., (1983), o acúmulo de tecido adiposo na região da crina, o acúmulo de gordura na base da cauda com o uso de ultrassonografia e com o uso de fita métrica foi aferida a circunferência do pescoço em três pontos pré-definidos com 25, 50 e 75% em relação à medida do comprimento. Os dados foram coletados com o intervalo de 15 dias durante 150 dias. Para a análise histopatológica foram coletados os dados antes e após 5 meses de indução da obesidade, as amostras para a análise histopatológica foram obtidas com a realização de biópsia da parede dorsal do casco. A análise estatística utilizada para verificar a correlação das variáveis paramétricas foi empregado o teste de correlação de Pearson, e para os dados não paramétricos para mensurar a correlação do escore corporal e o escore da crista do pescoço foi usado o teste de correlação de Spearman ($P \leq 0,05$). Os resultados confirmaram a hipótese de que existe correlação entre os parâmetros de adiposidade, biomarcadores e parâmetros histopatológicos do tecido lamelar em cavalos. Em conjunto, nossos achados demonstram que o crescente acúmulo de adiposidade regional, o aumento dos níveis de biomarcadores plasmáticos e a ocorrência de resistência à insulina se correlacionam com o desenvolvimento de alterações no tecido lamelar do casco, podendo ser utilizados como métodos de diagnóstico precoce para a laminite endócrinopática equina.

Palavras Chave: Cavalos, Laminite, Resistência à Insulina, Síndrome Metabólica Equina.

ABSTRACT

Equine Metabolic Syndrome (EMS) is characterized by the association of dysfunctions such as obesity and insulin resistance. The term EMS has been proposed for horses whose clinical examination results suggest a greater risk for the development of laminitis, this term was adopted because of its similarity to the Metabolic Syndrome in Humans, which is a set of risk factors used to predict the occurrence Of coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus in humans. The objective of the present study was to investigate the existence of a possible correlation between the parameters of adiposity, metabolic dysfunction biosynators and histopathological parameters of the lamellar tissue of horses with induced obesity and to try to identify possible methods of early diagnosis for SME. A total of 9 adult horses, 4 castrated males and 5 females, who underwent obesity induction, were used to analyze the plasma variables. Blood samples from the jugular vein were collected to measure the plasma values of HDL-c, LDL-c, VLDL- C, AGNE, fructosamine (FRUT), glucose (GLI), cholesterol (COL) and triglycerides (TRIG) were used to evaluate the body condition of the animals, the body weight was measured using the Henneke et al. Al., (1983), the accumulation of adipose tissue in the horsehair region, the accumulation of fat at the base of the tail with the use of ultrasound and with the use of tape measure was measured the circumference of the neck at three predefined points with 25, 50 and 75% relative to the length measurement. Data were collected with the interval of 15 days for 150 days. For the histopathological analysis data were collected before and after 5 months of obesity induction, the samples for the histopathological analysis were obtained with a biopsy of the dorsal wall of the hull. The statistical analysis used to verify the correlation of the parametric variables was used the Pearson correlation test, and for the non-parametric data to measure the correlation of the body score and the neck crest score the Spearman correlation test ($P \leq 0.05$). The results confirmed the hypothesis that there is a correlation between the parameters of adiposity, biosynthesis and histopathological parameters of lamellar tissue in horses. Taken together, our findings demonstrate that the increasing accumulation of regional adiposity, increased levels of plasma biosynthesis and the occurrence of insulin resistance correlate with the development of changes in lamellar tissue of the hull and can be used as early diagnosis methods for Equine endocrinopathic laminitis.

Key words: Horse, Laminitis, Insulin Resistance, Equine Metabolic Syndrome.

1. INTRODUÇÃO

As características que um equino deve possuir para se enquadrar com síndrome metabólica equina (SME) são: aumento da adiposidade em locais específicos, desregulação insulínica caracterizada por hiperinsulinemia e a predisposição de desenvolver laminite clínica ou subclínica (Frank et al., 2010). Não se sabe exatamente quais os mecanismos que interligam essas três características. Contudo sabe-se que a ingestão de dietas hipercalóricas, especialmente aquelas ricas em carboidratos não estruturais, pode causar uma série de alterações endócrinas e metabólicas como a supra regulação de marcadores inflamatórios, propensão de desenvolver hipertensão arterial, infertilidade, hipertrigliceridemia e hiperleptinemia (Vick et al., 2007, Vick et al, 2008, Bailey et al., 2008, Carter et al., 2009, Rugh et al., 1987, Frank et al., 2010).

A SME pode prenunciar o desenvolvimento de outras afecções além da laminite, como a síndrome hiperlipidêmica equina (lipidose hepática), osteocondrose, a “diabetes mellitus” tipo 2, mas a laminite representa a doença crônica com maior risco de se desenvolver em animais com essa

síndrome (Johnson, 2002, Frank et al., 2010, Frank, 2011). Entretanto, nem todos os cavalos com SME são obesos e nem todos os animais obesos desenvolvem a RI (Treiber et al., 2006).

O acúmulo de gordura regional em equinos, principalmente quando elas estão localizadas ao longo da crista do pescoço tem evidenciado uma correlação positiva em relação à SME, isso se deve à grande quantidade de citocinas que esses acúmulos de adipócitos liberam, exercendo ações autócrinas e parácrinas importantes, como a ação nos receptores de insulina, contribuindo para o desenvolvimento de resistência à insulina (Johnson et al., 2010, Treiber et al., 2006, Carter et al., 2009, Paz et al., 2013).

Vários estudos têm tentado associar biomarcadores metabólicos, endócrinos e inflamatórios com medidas de adiposidade e sinais de laminite em estudos observacionais. Entretanto, as relações entre as características fenotípicas primárias e as medidas de diagnóstico para a SME são complexas, sofrendo influência do ambiente e alterações de características individuais como a raça, idade, sexo, fatores esses, que dificultam a criação de critérios para diagnósticos claros (Geor et al., 2013).

O objetivo deste experimento foi verificar correlações significativas entre biomarcadores metabólicos, alterações de adiposidade e alterações histológicas do casco, com a finalidade de entender como o desenvolvimento de obesidade desencadeia alterações endócrinas e metabólicas sistêmicas e alterações localizadas nos cascos. Mais além, este trabalho pretende contribuir para as buscas de biomarcadores de alterações precoces de laminite tentando obter ferramentas para a realização do diagnóstico precoce para a SME.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Nove equinos sofreram indução de obesidade durante um período experimental de 150 dias, como descrito no capítulo 2. Conforme descrito nos capítulos anteriores, em intervalos de 15 dias por cinco meses, amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia jugular, para a mensuração dos valores de HDL-c, LDL-c, VLDL-c, AGNE, frutamina (FRUT), glicose (GLI), colesterol (COL), triglicérides (TRIG), bem como insulina, glicose e seus proxies.

A condição corporal foi graduada de 1 a 9 Henneke et al., (1983), o acúmulo de tecido adiposo na região da crina foi graduado de 1 a 5 e avaliado pelas medidas de circunferências do pescoço. O acúmulo de gordura na base da cauda foi avaliado por ultrassonografia. Para a análise histopatológica foram coletadas duas biópsias antes e ao final do experimento e várias características foram determinadas.

2.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diversas variáveis foram correlacionadas entre si utilizando-se os testes de Pearson para os dados paramétricos ou o teste de Spearman para os dados não paramétricos como escore corporal e CNS, por meio de programa computacional estatístico (SAS – University). Para todas as análises o nível de significância foi de $P \leq 0,05$. As correlações foram classificadas como muito forte ($>0,90$), forte (0,70 a 0,89), moderada (0,50 a 0,69), leve (0,30 a 0,49) e fraca (0,30).

3. RESULTADOS

Considerando-se as variáveis de obesidade e os biomarcadores plasmáticos, os índices de correlação que apresentaram significância estatística ($P \leq 0,05$) estão representados na Tabela 21. Dentre os índices de obesidade subjetivos e objetivos, os que apresentaram maior índices foram o ECC com MCP50% (0,82) e UBC (0,88). Entre variáveis de obesidade e biomarcadores os melhores foram MCP75% e insulina basal (0,86) e ECC com G/I e RISQI (-0,72) e (-0,79) respectivamente,

Tabela 21: Índices de correlações significativos entre variáveis de obesidade e biomarcadores plasmáticos em equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias.

	ECC [‡]	Peso	ECP [‡]	MCP		
				25%	50%	75%
				r	r	r
P	0,54***	-	0,45***	0,82***	0,73***	0,77***
ECC[‡]	-	0,55***	0,66***	0,77***	0,82***	0,77***
ECP[‡]	0,66***	0,45***	-	0,48***	0,52***	0,24*
MCP 25%	0,77***	0,82***	0,48***	-	0,84***	0,92***
MCP 50%	0,82***	0,73***	0,52***	0,84***	-	0,34*
MCP 75%	0,77***	0,77***	0,49***	0,86***	0,92***	-
GLI	-	-	0,20*	-	-	-
HDL-c	0,21*	-	0,32**	-	-	-
LDL-c	0,38***	-	0,30**	-	0,25*	-0,26*
VLDL-c	-	-0,28*	-	-	-	-
FRUT	-	-	0,24*	-	-	-
TRI	-0,23*	-0,38**	-0,26*	-0,32**	-0,28*	0,67***
COL	0,27*	-	0,30**	-	-	-
UBC	0,88***	0,48**	0,56***	0,65***	0,75***	0,24 [‡]
Insulina	0,60***	-	0,44**	0,31*	0,36**	0,86***
G:I	-0,72***	-0,37**	-0,59***	-0,56***	-0,64***	-0,44**
RISQI	-0,69***	0,27*	-0,59***	-0,47***	-0,54***	-0,50**
MIRG	0,57***	0,26*	0,27*	0,39**	0,47**	0,50***
HOMA-IR	0,44**	-	0,40**	-	-	-

Teste de Person para as amostras paramétricas e [‡] Teste de Friedman para as amostras não paramétricas ($P \leq 0,05$). $P \leq 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$, ^{Tendência}. ECC: Escore de condição corporal, ECP: Escore da crista do pescoço, MCP: Medida da circunferência do Pescoço, P: Peso, GLI: Glicose, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein FRUT: Frutosamina, TRI: Triglicérides, COL: Colesterol, UBC: Ultrassom da base da Cauda, G:I: Relação entre a glicose com a insulina, RISQI: , MIRG:, HOMA-IR: modelo de avaliação de homeostase

As correlações dos valores de proxies com biomarcadores estão representados na Tabela 22. Destaca-se o UBC, que demonstrou correlações moderadas com todos os proxies.

Tabela 22: Índices de correlações significativos entre valores de proxies e biomarcadores e UBC em equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias.

	G:I	RISQI	MIRG	HOMA-IR
	r	R	r	R
GLI	-	-0,28*	-0,56***	0,62***
HDL-c	-0,39*	-0,51***	-0,55***	0,45**
LDL-c	-0,43*	-0,45**	0,40**	0,26*
FRUT	-0,39*	-0,54***	-	0,49***
COL	-0,48***	-0,57***	-	0,46*
AGNE	-	-	0,33*	-
UBC	-0,56*	-0,52**	0,58**	0,45*
Insulina	-0,67***	-0,81***	0,50**	0,91***

Teste de Person para as amostras paramétricas ($P \leq 0,05$). ($P \leq 0,05$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$. G:I: Relação entre a glicose com a insulina, RISQI: , MIRG:, HOMA-IR: modelo de avaliação de homeostase, GLI: Glicose, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, FRUT: Frutosamina, COL: Colesterol, AGNE: Ácidos graxos não esterificados, UBC: Ultrassom da base da Cauda.

Os índices de correlações entre variáveis de obesidade e alterações histológicas do tecido lamelar estão representados na Tabela 23. O parâmetro de alteração histológica mais consistente e com maiores índices foi a hiperplasia de camada suprabasal na região axial com destaque para as fortes correlações com ECC (0,86) e MCP75% (0,82).

Tabela 23: Índices de correlações significativos entre variáveis de obesidade e alterações histológicas do tecido lamelar em equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias.

	ECC [‡]	Peso	ECP [‡]	MCP			PAM
				25%	50%	75%	
	R	r	r	r	R	r	r
HCS LES Axial	0,51*	0,59*	-	-	-	-	-
LES Axial Bifurcado	0,51*	0,53*	-	0,46*	0,58*	-0,62*	-
LES axial fundidos	0,49*	-	0,42 [‡]	-	0,42 [‡]	-	-0,51*
Comprimento LES abaxial	-0,56*	-0,42 [‡]	-0,46*	-0,50*	-0,52*	-0,57*	-
LES intermédio Padrão	-0,59**	-0,53*	-	-0,59*	-0,54*	0,67*	-
HCS LES Intermédio	0,60**	0,59**	0,48*	0,63*	0,61*	0,67*	-
LES Intermédio Bifurcado	0,52*	-	-	-	-	-	-
Comprimento LES intermédio	-0,54*	-	-	-0,4 [‡]	-0,42 [‡]	-0,4 [‡]	-
LES Abaxial Padrão	-0,68**	0,64**	-0,49*	-0,61**	-	0,82***	-
HCS LES Abaxial	0,86***	-0,47***	0,67*	0,71**	0,82***	0,47*	-

Teste de Person para as amostras paramétricas e * Teste de Friedman para as amostras não paramétricas ($P \leq 0,05$). *

P<0,05, ** P<0,001, *** P<0,0001, ‡ Tendência. ECC: Escore de condição corporal, ECP: Escore da crista do pescoço, MCP: Medida da circunferência do Pescoço, HCS LES: Hiperplasia da camada suprabasal da Lâmina epidermal secundária, LES: Lâmina epidermal secundária.

Os índices de correlações entre proxies e alterações histológicas do tecido lamelar estão representados na Tabela 24. Novamente houve destaque para o parâmetro hiperplasia de camada suprabasal na região axial com correlação forte com MIRG (0,78) e moderada com G:I (-0,66) e RISQI (-0,61).

Tabela 24: Índices de correlações significativos entre valores de proxies e variáveis histológicas do tecido lamelar do casco de equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias.

	G:I	RISQI	MIRG	HOMA-IR
	r	r	r	r
HCS LES Axial	-	-0,24 [‡]	0,59*	-
LES intermediário padrão	0,53*	0,43 [‡]	-0,51*	-
HCS LES interm.	-0,43 [‡]	-0,44 [‡]	0,49*	0,50*
LES Intermédio Bifurcado	-	-	0,47*	0,69**
LES Abaxial Fundidos	-	-	-	0,57*
Comprimento LES Interm.	-	-	-0,50*	-
LES abaxial Padrão	0,53*	0,45 [‡]	-0,52*	-
HCS LES abaxial	-0,66**	-0,61*	0,78**	-
Comprimento do GQ da porção abaxial da LEP (µm)	-0,50*	-0,43 [‡]	-	-
LES Abaxial Padrão	0,50*	0,44 [‡]	-0,56*	0,62*
LEP afiado	-0,50*	-0,52*	0,62*	-0,52***

Teste de Person para as amostras paramétricas. (P ≤ 0,05). * P < 0,05, ** P < 0,001, *** P < 0,0001, † Tendência. G:I: Relação entre a glicose com a insulina, RISQI: , MIRG: , HOMA-IR: modelo de avaliação de homeostase, HCS LES: Hiperplasia da camada suprabasal da Lâmina epidermal secundária, LES: Lâmina epidermal secundária, GQ: Grau de queratinização.

Os índices de correlações significativos concentrações plasmáticas de glicose, frutamina e frações de colesterol e variáveis histológicas do tecido lamelar do casco estão representados na Tabela 25. Também houve destaque para o parâmetro hiperplasia de camada suprabasal na região axial com correlação moderada com HDL-c (0,65) e LDL-C (0,56) e leve com FRUT (0,46).

Tabela 25: Índices de correlações significativos entre concentrações plasmáticas de glicose, frutossamina e frações de colesterol e variáveis histológicas do tecido lamelar do casco de equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias.

	GLI	HDL-c	VLDL-c	LDL-c	FRUT
	R	r	R	r	R
LES axial Padrão	0,67*	-	-	-	-
LES axial Fundidos	-	-	-	0,43 [‡]	-
HCS LES Abaxial	-0,70**	-	-	-	-
LES axial Queratinizados	-	-	-	0,51*	-
LES axial Clava	-	-	0,43 [‡]	-	-
LES axial Bifurcado	-0,48*	-	-	0,40 [‡]	-
GQ axial LEP-Normal	-	-	-	-0,60*	-
GQ axial LEP ligeir. Aumen.	-	0,44	-	0,49*	-
GQ axial LEP Moder. Aumen.	-	-	-	0,55*	-
LES intem. Padrão	0,59*	-0,53*	-	-0,44 [‡]	-0,45*
LES interm. Queratinizados	-	-	-	0,51*	-
HCS LES Interm.	0,47*	-	-	-	-
Comprimento LES Interm.	0,53*	-	-	-	-
LES abaxial Padrão	0,50*	-0,52*	-	-0,48*	-0,45 [‡]
LES abaxial Cônico	-0,50*	-	-	-	-
LES abaxial Clava	0,61*	-	-	-	-
HCS LES abaxial	-0,63*	0,65**	-	0,56*	0,46*
LEP axial Bifurcada	0,50*	-	-	-	0,52*
LEP abaxial Padrão	0,51*	-	-	-	-
LEP abaxial Afiado	-	-	-	0,43 [‡]	-
LEP abaxial Cônico	-0,58*	-	-	-	-
LES abaxial Clava	0,60*	-	-	-	-

Teste de Person para as amostras paramétricas ($P \leq 0,05$). ($P \leq 0,05$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$, [‡] Tendência. GLI: Glicose, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein FRUT: Frutossamina, MTD: Membro torácico direito, MTE: Membro torácico esquerdo, Espessura da sola: Profundidade ou espessura de sola, Afundamento: distância entre os planos horizontais entre a banda coronária e o ápice do processo extensor da falange distal, LES: Lâmina epidermal secundária, HCS LES: Hiperplasia da camada suprabasal da Lâmina epidermal secundária, LEP: Lâmina epidermal primária, GQ: Grau de queratinização.

Os índices de correlações significativos das concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total, AGNE e insulina com variáveis histológicas do tecido lamelar do casco estão representados na Tabela 26. Houve destaque para os parâmetros hiperplasia de camada suprabasal e forma de clava nas SEL da região axial com correlações leve e moderadas com concentrações plasmáticas de colesterol total, AGNE e insulina.

Tabela 26: Índices de correlações significativos de concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total, AGNE e insulina com variáveis histológicas do tecido lamelar do casco de equinos submetidos a indução da obesidade por 150 dias.

	TRIG	COL	AGNE	Insulina
	r	r	r	R
LES axial Fundidos	-	-	-	0,61*
LES axial Queratinizados	-	-	0,52*	-
LES axial Clava	0,43 [‡]	-	-	-
GQ axial LEP-Normal	-	-0,57*	-	-
GQ axial LEP ligeir. Aumen.	-	0,50*	-	-
GQ axial LEP Moder. Aumen.	-	0,45 [‡]	0,43 [‡]	-
LES intem. Padrão	-	-0,53*	-	-
LES interm. Queratinizados	-	-	0,52*	-
LES Interm. Clava	-	-	-	0,53*
LES Interm. Bifurcado	-	-	-	0,74**
LES abaxial Padrão	-	-0,55*	-	-0,46 [‡]
LES abaxial Clava	-	-	-0,61*	-
HCS LES abaxial	-	0,66*	0,42 [‡]	0,53*
LES abaxial Afiado	-	0,46*	0,54*	0,69*
LES abaxial Clava	-	-	-0,61*	-
LES abaxial Fundidos	-	-	0,41 [‡]	0,57*
Compr. GQ axial LEP (µm)	-	0,45 [‡]	0,51*	-

Teste de Person para as amostras paramétricas ($P \leq 0,05$). ($P \leq 0,05$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$, ^{Tendência}. TRI: Triglicérides, COL: Colesterol, AGNE: Ácidos graxos não esterificados, MTD: membro torácico direito, MTE: Membro torácico esquerdo, Espessura da sola: Profundidade ou espessura de sola, Afundamento: distância entre os planos horizontais entre a banda coronária e o ápice do processo extensor da falange distal, LES: Lâmina epidermal secundária, HCS LES: Hiperplasia da camada suprabasal da Lâmina epidermal secundária, LEP: Lâmina epidermal primária, GQ: Grau de queratinização.

4. DISCUSSÃO

Por meio do presente capítulo foi possível reunir em um único cenário a maior parte das informações registradas neste projeto. Também foi possível ter uma visão mais sólida da inter-relação entre as características de obesidade/adiposidade, alterações endócrinas e metabólicas sistêmicas e suas repercussões sobre o tecido lamelar dos cascos. Os resultados das análises de correlação confirmam a hipótese de que existe correlação entre os parâmetros de adiposidade, biomarcadores e parâmetros histopatológicos do tecido lamelar em cavalos.

O presente estudo demonstrou a existência de correlações positivas entre os parâmetros de adiposidade, o ECP, MCP e o uso do UBC com o ganho de peso e com a mensuração do ECC, evidenciando que os equinos utilizados neste experimento distribuíram seu acúmulo de gordura

nos locais aqui propostos. Essas medições podem auxiliar para a realização do acompanhamento do ganho de peso e esses parâmetros de obesidade podem ser utilizados como pontos de referência para demonstrar se o animal está apresentando acúmulo de gordura regionalizada.

Também foi observado por vários autores que a metodologia de Henneke et al., (1983) não é fidedigna quando analisamos a sinalização do acúmulo de gordura regional, sendo necessário o uso de outras estratégias para identificar se o equino está apresentando acúmulo de gordura regionalizada (Geor, 2008, Mottet e Hiney, 2009, Kane et al., 1989, Westervelt et al., 1976, Françoso et al., 2012).

Entretanto, as fortes correlações identificadas entre o ECC e as medidas objetivas de deposição de gordura no pescoço e na base cauda demonstram que este método é eficiente para quantificar a adiposidade localizada em equinos estíços da raça Mangalarga Marchador. Mais além, o ECC foi o parâmetro de adiposidade que apresentou os melhores índices de correlação com os proxies, demonstrando que a graduação da condição corporal pode ser usada como marcadora do desequilíbrio insulínico em equinos desse tipo. Destaca-se ainda o fato do ECC apresentar forte correlação (0,86) com a ocorrência de hiperplasia das células na camada suprabasal, umas das principais alterações verificada após a dieta na análise histopatológica do casco.

Os valores de correlação entre os biomarcadores plasmáticos e os parâmetros de adiposidade foram significativos principalmente nas variáveis triglicérides e insulina, que apresentaram valores significativos com o ECC, peso dos animais, ECP e todas as medições MCP, não sendo relevante com as mensurações da UBC e PA. Já a glicose e a frutossamina apresentaram correlações positivas apenas com ECP. O colesterol e o HDL-c se correlacionaram apenas com o ECC e o ECP. O LDL-c apresentou correlação expressiva com ECC, ECP e as medições 50% e 75% do MCP.

Esses resultados confirmam a teoria vigente de que o acúmulo de gordura regionalizada está intimamente correlacionado com alterações metabólicas resultantes da SME, principalmente quando são observados a elevação das triglicérides e da insulina, como demonstrado neste experimento (Carter et al. 2009, Vick et al., 2008, Johnson, 2002, Sutherland et al., 2004, Vick et al., 2007).

Outra situação demonstrada neste experimento foi de que alguns biomarcadores sinalizaram correlações com alguns marcadores de adiposidade de maneira independente, essa característica pode ser explicada pela teoria onde dependendo da localização da gordura, ela pode exercer efeitos diferentes no organismo do animal, sendo teorizado de que os adipócitos possuem características diferentes entre si, dependendo de sua localização (Chadakov et al., 2003, Lyon et al., 2003).

Corroborando essa ideia, foi observado em humanos que os adipócitos presentes no omento e na gordura mesentérica apresentam maior quantidade de macrófagos ativos, secretando assim uma maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias na circulação, deixando esses pacientes com uma sinalização pró-inflamatória exacerbada. Outra característica dos adipócitos omentais é a presença de conversores esteroidais, entre eles, a enzima 11β -hidroxiesteróide desidrogenase – 1 (11β -HSD), responsável por converter a cortisona inativa para o cortisol ativo, esse cortisol derivado do tecido adiposo está intimamente ligado na patogênese da RI e SM em humanos (Matsuzawa, 2008; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003).

Seguindo a mesma premissa, uma série de autores têm teorizado que o acúmulo de gordura em determinadas regiões do subcutâneo de equinos é responsável pelo desenvolvimento da SME. Por exemplo, o acúmulo de gordura no pescoço apresentou uma maior expressão do gene de IL-1 β e IL-6, já a gordura visceral demonstrou uma maior quantidade de macrófagos e leptina (Weber et al., 2013, Maury e Brichard, 2010, de Luca e Olefsky, 2008, Vick et al., 2008, Burns et al., 2010). A elevação da deposição de gordura na crista do pescoço e o aumento da circunferência do pescoço está intimamente correlacionado com quadros de resistência à insulina. Packer et al. (2010) observaram correlação com o acúmulo de gordura retro abdominal em equinos com a expressão de genes de leptina. Xavier et al., (2014) constataram correlação com a análise de gordura por via ultrassonográfica na região da base da cauda e o ECC com alterações radiográficas condizentes com a rotação da terceira falange.

Os proxies G:I e RISQI apresentaram valores de correlação negativa significativa com todos os parâmetros de adiposidade avaliados neste experimento, sinalizando que quanto maior grau de obesidade que esses animais apresentam menor serão os valores desses proxies, recordando que quanto menor o valor de G:I e RISQI maior a chance dos animais serem resistentes à insulina. O proxie MIRG apresentou correlação positiva com todas as mensurações de adiposidade, entretanto o HOMA-IR apresentou correlação positiva apenas com o ECC e ECP, recordando que o MIRG e o HOMA-IR possuem comportamento oposto aos dois primeiros proxies, quanto maior o seu valor maior será a chance desse animal desenvolver RI. Esses resultados corroboram a teoria de que animais obesos tem maior probabilidade de desenvolver resistência à insulina (Packer et al., 2010, Carter et al. 2009, Vick et al., 2008).

Existem duas teorias que inter-relacionam a obesidade com a RI. A primeira segue a premissa de que a diminuição da regulação da sinalização da insulina é causada pela ação das adipocinas e citocinas produzidas pelo tecido adiposo. A segunda ocorre através do acúmulo intracelular de lipídios nos tecidos sensíveis à insulina. As duas teorias comprometem as funções normais dessas células através da diminuição da sinalização dos receptores de insulina (Summers, 2006).

Outras informações interessantes observadas neste experimento foram as correlações entre os parâmetros de adiposidade com as alterações da análise histopatológica do tecido laminar. Essas correlações indicam que existe uma relação de adiposidade com alterações histológicas do tecido laminar.

Tais achados corroboram os encontrados por Xavier e colaboradores (2014) que observaram correlação positiva entre a análise ultrassonográfica da base da cauda e o aumento do ECC com alterações radiográficas do casco condizentes à laminite. Orsini et al. (2013) relacionaram entre os fatores de risco de um cavalo desenvolver laminite o ECC maior do que 6. Entre as teorias da laminite resultante da SME é a de que o tecido adiposo pode secretar citocinas inflamatórias no sistema circulatório como TNF – α , adipocina e a leptina, levando à um estado inflamatório persistente, essa situação pode contribuir ao desenvolvimento de laminite nos animais obesos. Outra proposta para a fisiopatologia da laminite endocrinopática, seria pelo excesso de peso desses animais, promovendo uma sobrecarga na interface dermo-epidérmica, podendo assim predispor ao desenvolvimento de laminite (Tadros e Frank, 2013). Ressaltando que os animais obesos têm grande chance de desenvolver a SME e que uma das consequências dessa síndrome é o desenvolvimento de laminite endocrinopática.

As concentrações plasmáticas de insulina, glicose, HDL-c, LDL-c e frutossamina apresentaram correlações com os proxies G:I, RISQI, MIRG e o HOMA-IR, e o colesterol demonstrou

correlação positiva somente com o proxie MIRG. A possível interpretação para que animais com RI apresentem alterações de dislipidemias e trigliciridemias é de que o aumento da insulina circulante interfere na atividade do hormônio sensível à lipase (HSL). Isso acarreta no aumento da lipólise dos tecidos, tendo como consequência o aumento dos triglicérides e suas variantes na circulação. Outro efeito da elevação da RI é de que a diminuição da captação da glicose nos tecidos modifica a glicogênese hepática, causando uma autoperpetuação da hiperlipemia nesses animais (Jeffcoat e Field, 1985, McKenzie, 2011).

A medição e o acúmulo de gordura da base da cauda se mostrou com uma correspondência significativa com os proxies utilizados neste experimento, mostrando uma correlação proporcional ao seu aumento, com o desenvolvimento de resistência à insulina nesses animais. Essa característica morfológica já foi utilizada para demonstrar se um equino apresenta os sinais fenotípicos de um equino com síndrome metabólica (ACVIM, 2010). Carter e colaboradores (2009) observaram alterações condizentes à SME em equinos com o aumento no acúmulo de gordura na base da cauda.

Os sinais de que a resistência à insulina pode desencadear alterações metabólicas e por consequência resultar em comprometimento da arquitetura lamelar do casco, foi observada neste experimento, por meio da constatação de correlação entre os proxies com os biomarcadores e alterações na análise histopatológica do tecido lamelar do casco.

Os proxies também apresentaram correlações com algumas alterações constatadas na análise histopatológica do tecido laminar dos cascos, demonstrando que animais com RI apresentam modificações características de laminite. Lembrando que animais com SME possuem predisposição para o desenvolvimento de laminite e uma entre as características fenotípicas que um equino precisa apresentar para ser considerado com SME é a resistência à insulina (ACVIM, 2010). Um equino com SME tem entre 50 a 80% de chance de desenvolver laminite (Treiber et al., 2006, Donaldson et al., 2002).

Cavalos com altas concentrações de insulina plasmática ($> 188\mu\text{UI/mL}$) possuem maior chance de desenvolver laminite, possuindo tempo de vida estimado de até 2 anos após seu diagnóstico. A associação entre equinos com quadros de resistência à insulina com o desenvolvimento de laminite foi observado pela primeira vez nos anos 80, sendo confirmado em outros estudos no decorrer dos anos (de Laat et al., 2010, McGowan et al., 2004).

A relação entre o aumento da disponibilidade da insulina circulatória com quadros de laminite pode ser responsabilizada pelo fato de a insulina possuir um fator pró-inflamatório, promovendo elevação da matriz metaloproteinase 9 (MMP-9), TNF – α e IL – 6 plasmáticas (Suagee et al., 2011). Outra teoria é de que a ação comprometida da insulina desencadeia uma intolerância à glicose, podendo desenvolver glicotoxicidade, dando origem a espécies reativas de oxigênio (ROS) como os radicais de superóxido (Cosentino e Luscher, 1998, Rosedale, 2004).

O estresse oxidativo desencadeia uma série de alterações, como a diminuição da produção do óxido nítrico, a elevação da produção de endotelina e elevação de uma atividade pró-coagulativa. Em decorrência a esses fatores, observa-se aumento da vasopasticidade, hipercoagulabilidade e interferência da perfusão capilar. Essa situação pode ser considerada como fator desencadeante para o desenvolvimento da laminite em equinos, conformes (Zhang et al., 2012, de Laat et al. 2012).

Também tem sido observado que animais com elevação dos valores de insulina plasmática apresentam um maior valor de IGF-1 livre circulante. O IGF-1 livre é responsável por uma série de respostas biológicas, dentre elas o estímulo do crescimento, a proliferação, a diferenciação celular e a apoptose (Chitnis et al., 2008). Em animais com laminite endocrinopática foi observado aumento na proliferação das células do tecido laminar durante a fase de desenvolvimento da laminite induzida por insulina. Essa proliferação celular é praticamente inexistente em animais saudáveis e pode enfraquecer o aparato lamelar, podendo desencadear o seu desenvolvimento (Laat et al, 2013, Daradka e Pollitt, 2004). A aumento da ocorrência de hiperplasia de células na camada suprabasal foi uma das principais alterações verificadas no presente estudo e teve forte correlação do escore da condição corporal.

Por fim, foram observadas correlações entre as alterações histopatológicas do tecido laminar com os biomarcadores plasmáticos analisados neste experimento. As concentrações de glicose, LDL-c e AGNE apresentaram maior correlação com um maior número de variáveis analisadas. Mas todos biomarcadores plasmáticos se correlacionaram com as alterações demonstradas com a avaliação histopatológica.

Como já foi relatado anteriormente neste texto os equinos obesos apresentam elevação dos níveis de lipídios e lipoproteínas plasmáticas. A elevação dos valores de lipídios plasmáticos em ratos modifica a expressão de IL-6 e TNF (Carter et al, 2009, Ajuwon e Spurlock, 2005). Frank (2006) observou que os valores de VLDL, HDL, LDL e AGNE aumentaram em equinos obesos com RI.

O aumento da concentração plasmática de triglicérides e lipoproteínas, alterações da sensibilidade à insulina através dos valores dos proxies RISQI e MIRC e o aumento do valor de insulina plasmática podem ser considerados como fatores de risco para o desenvolvimento de laminite endocrinopática (Carter et al., 2009, Borer et al., 2012a, Borer et al., 2012b).

5. CONCLUSÃO

Os parâmetros de adiposidade, os níveis plasmáticos de biomarcadores de alterações endócrinas/metabólicas e as características histopatológicas do tecido lamelar se correlacionam significativamente em cavalos com obesidade induzida.

A avaliação da condição corporal baseada no escore de 1 a 9 se mostrou um método simples e útil para ser utilizado em equinos com fenótipo típico de marchadores nacionais, tanto para avaliar a deposição regional de tecido adiposo, mas também como indicador indireto do desenvolvimento da síndrome metabólica equina baseada na ocorrência de distúrbio metabólico sistêmico e de alterações histológicas no tecido lamelar do casco.

Em conjunto, a ocorrência destes achados demonstra que o crescente acúmulo de adiposidade regional, o aumento de biomarcadores plasmáticos e a ocorrência de resistência à insulina se correlacionam com o desenvolvimento de alterações no tecido lamelar do casco, podendo ser utilizados como possíveis métodos de diagnóstico precoce para a laminite endocrinopática equina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJUWON, K. M.; SPURLOCK, M. E. Palmitate activates the NFkB transcription factor and induces IL-6 and TNFa expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.*, v. 135, p. 1841–1846, 2005.

BAILEY, S. R.; HABERSHON-BUTCHER, J. L.; RANSOM, K. J.; et al. Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 69, n. 1, p. 122-129, 2008.

BORER, K.E.; BAILEY, S.R.; MENZIES-GOW, N.J.; et al. Use of proxy measurements of insulin sensitivity and insulin secretory response to distinguish between normal and previously laminitic ponies. *Equine Vet. J.*, v. 44, p. 444-448, 2012a.

BORER, K. E.; BAILEY, S. R.; MENZIES-GOW, N.J.; et al. Effect of feeding glucose, fructose, and inulin on blood glucose and insulin concentrations in normal ponies and those predisposed to laminitis. *J. Anim. Sci.*, 2012b.

CARTER, R. A.; GEOR, R. J.; BURTON STANIAR, W. et al. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Vet. J.*, v.179, p.204-210, 2009.

CHITNIS, M.M.; YUEN, J.S.; PROTHEROE, A.S.; et al. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin. Cancer Res.*, v.14, p. 6364-6370, 2008.

COSENTINO, F.; LUSCHER, T.F. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, Suppl. 32, p. S54-S61, 1998.

DARADKA, M.; POLLITT, C.C. Epidermal cell proliferation in the equine hoof wall. *Equine Vet. J.*, v. 36, p. 236–241, 2004.

de LAAT, M.A., McGOWAN, C.M., SILLENCE, M.N.; POLLITT, C.C. Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Vet. J.*, v. 42, p. 129-135, 2010.

de LAAT, M. A.; SILLENCE, M. N.; McGOWAN, C. M.; et al. Continuous intravenous infusion of glucose induces endogenous hyperinsulinemia and lamellar histopathology in Standardbred horses. *Vet. J.*, v. 91, n. 3, p. 317–322, 2012.

de LAAT, M. A.; POLLITT, C. C.; KYAW-TANNER, M. T.; et al. A potential role for lamellar insulin-like growth factor-1 receptor in the pathogenesis of hyperinsulinaemic laminitis. *The Vet. J.* v. 197, p. 302-306, 2013.

de LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* v. 582, p. 97–105, 2008.

DONALDSON, M.T.; LAMONTE, B.H.; MORRESEY, P.; et al. Treatment with pergolide or cyproheptadine of pituitary pars intermedia dysfunction (equine Cushing's disease). *J. Vet. Intern. Medicine.*, v. 16, n. 6, p.742–746, 2002.

FERGUSON, J.D. 1996. Implementation of a body condition scoring program in dairy herds. Feeding and managing the transition cow. In: Proceedings of the Pennsylvania Annual

Conference, University of Pennsylvania, Center for Animal Health and Productivity, Kennett Square, PA.

FRANÇOZO, R.; MARTINS, R. A. D. T.; GONZAGA, I. V. F.; et al. Avaliação do escore corporal em equinos por meio da ultrassonografia. *Rev. Ed. Cont. Med. Vet. Zoot.*, v. 10, n. 1, p. 78, 2012.

FRANK, N.; ELLIOTT, S. B.; BRANDT, L. E.; KEISLER, D. H. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *JAVMA*, v. 228, n. 9, p. 1383 - 1390, 2006.

FRANK, N.; GEOR, R. J.; BAILEY, S. R.; et al. Equine Metabolic Syndrome. *J. Vet. Intern. Med. V.*, v. 24, p. 467 – 475, 2010.

FRANK, N. Equine metabolic syndrome. *Vet. Clinic No. Am. Equine Pract.*, v. 27, f. 1, p. 73–92, 2011.

GEOR, R. J. Metabolic Predispositions to Laminitis in Horses and Ponies: Obesity, Insulin Resistance and Metabolic Syndromes. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 28, n. 12, p. 753 – 759, 2008.

GEOR, R.J.; McCUE, M. E.; SCHULTZ, N. Current understanding of the equine metabolic syndrome phenotype. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 841-842, 2013.

HENNEKE, D.R.; POTTER, G.D.; KREIDER, J.L. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, v. 21, p. 897-909, 1983.

JEFFCOTT, L. B.; FIELD, J. R. Current concepts of hyperlipaemia in horses and ponies. *Vet. Rec.*, v. 116, n. 17, p. 461-466, 1985.

JOHNSON, P. J. The equine metabolic syndrome peripheral cushing's syndrome. *Vet. Clin. Equine Pract.*, v. 18, p. 271–293, 2002.

JOHNSON, P.J.; WIEDMEYER, C.E.; LACARRUBBA, A. et al. Laminitis and the equine metabolic syndrome Veterinary. *Clin. N. Am.: Equine Pract.*, v.26, p.239-255, 2010.

KANE, R. A.; FISHER, M.; PARRETT, D.; LAWRENCE, L. M. Estimating fatness in horses. Proceedings of the 10th Equine Nutrition and Physiology Society Symposium; 1989; Fort Collins, CO. p.127-131.

KIENZLE, E.; SCHRAMME, S. Body condition scoring and prediction of bodyweight in adult warm-blooded horses. *Pferdeheilkunde.*, v. 20, p. 517– 524, 2004.

LYON, C. J.; LAW, R.E.; HSUEH, W. A. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinol.*, v. 144, p. 2195-2200, 2003.

MATSUZAWA, Y. The role of fat topology in the risk of disease. *Int. J. Obes. (Lond).*, v. 32, f. 7, p.S83–92, 2008.

- MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 314, p. 1–16, 2010.
- McGOWAN, C. M.; FROST, R.; PFEIFFER, D. U.; et al. Serum insulin concentrations in horses with equine Cushing's syndrome: response to a cortisol inhibitor and prognostic value. *Equine Vet. J.*, v.36, p. 295–298, 2004.
- McKENZIE, H. C. Equine hyperlipidemias. *Vet. Clin. Equine.* v. 27, p. 59-72, 2011.
- MOTTET, R. O. G.; HINEY, K. Revisiting the Henneke Body Condition Scoring System: 25 Years Later. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 29, n. 5, p. 417 – 418, 2009.
- ORSINI, J. A.; CLARK, K.; INGLES, J.; et al. Clinical risk factors for equine laminitis: observational findings. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 840, 2013.
- PACKER, M.J.; HUNTER, G.L.; TRAYHURN, P., et al. Adipose tissue-derived adiponectin expression is significantly associated with increased post operative mortality in horse undergoing emergency abdominal surgery. *Equine vet. J.*, v. 43, n. 39, p. 26-33, 2010.
- PAZ, C. F. R.; PAGANELA, J. C.; dos SANTOS, C. A.; et al. Relação entre obesidade, insulina plasmática e posicionamento da falange distal em equinos da raça Crioula. *Arq. Bra. Med. Vet.*, v. 65, n. 6, p. 1699 – 1705, 2013.
- ROSSDALE, P. D. Cushing's syndromes, insulin resistance and endocrinopathic laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 36, n. 3, p. 194-198, 2004.
- RUGH, K. S.; GARNER, H. E.; SPROUSE, R. F.; HATFIELD, D. G. Left ventricular hypertrophy in chronically hypertensive ponies. *Lab. Anim Sci.*, v. 37, n. 3, p. 335–338, 1987.
- SUAGEE, J. K.; CORL, B. A.; CRISMAN, M. V.; et al. Effects of acute hyperinsulinemia on inflammatory proteins in horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 142, p. 141-146, 2011.
- SUMMERS, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progr. Lipid Res.*, v. 45, p. 42–72, 2006.
- SUTHERLAND, J. P.; McKINLEY, B.; ECKEL, R. H. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, v. 2, p. 82–104, 2004.
- TADROS, E. M.; FRANK, N. Endocrine disorders and laminitis. *Equine Vet. J.*, v. 25, iss. 3, p. 152 – 162, 2013.
- TREIBER, K.H.; KRONFELD, D.S.; GEOR, R.J. Insulin resistance in equids; possible role in laminitis. *J. Nutr.*, v. 136, p. 2094S–2098S, 2006.
- VICK, M. M.; ADAMS, A. A.; MURPHY, B. A.; et al. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *J. An. Sci.*, v. 85, n. 5, p. 1144–55, 2007.

VICK, M. M.; MURPHY, B. A.; SESSIONS, D. R.; et al. Effects of systemic inflammation on insulin sensitivity in horses and inflammatory cytokine expression in adipose tissue. *Am. J. Vet. Res.*, v. 6, n. 1, p. 130–139, 2008.

WEBER, P. S. D.; SCHERMERHORN, K. N.; McCUTCHEON, L. J.; et al. Adipokine, chemokine, and cytokine expression profiles in adipose tissue depots of lean and overweight ponies. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 33, p. 838 – 859, 2013.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clinical Invest.*, v. 112, p. 1796–1808, 2003.

WESTERVELT, R. G.; STOUFFER, J. R.; HINTZ, H. F.; SCHRYVER, H. F. Estimating fatness in horses and ponies. *J. ANIM. SCI.*, v. 43, p. 781-785, 1976.

XAVIER, V. F.; LIMA, I. R.; MARVAL, C. A. D.; et al. Estudo radiográfico do posicionamento da falange distal e sua correlação com obesidade em equinos de patrulhamento da Polícia Militar do estado de Minas Gerais. *Ass. Br. Med. Vet. Zoot.*, v. 66, n. 3, p. 672 – 680, 2014.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, v.112, p. 1821–1830, 2003.

ZHANG, D. et al. Sensilla on the antennal funiculus of the horse stomach bot fly, *Gasterophilus nigricornis*. *Medical and Vet. Entomology*, v. 26, n. 3, p. 314-322, 2012.

7. CONCLUSÃO GERAL

Verificou-se que a dieta hipercalórica foi eficiente em promover aumento de peso e da deposição de gordura total e regional nos locais propostos neste experimento, se destacando a mensuração do ECC, a MCP na porção 50% e o UBC.

A indução da obesidade desencadeou um importante impacto no metabolismo dos equinos estudados com aumento nas concentrações sanguíneas de colesterol total, LDL-c e HDL-c. A resistência insulínica ficou evidente já nos primeiros 30 dias, pelo aumento dos níveis plasmáticos basais e pelas alterações em diversos proxies. Até os 90 dias foi possível verificar os efeitos desta resistência sobre o metabolismo da glicose, por meio dos aumentos nas concentrações basais de glicose e frutossamina e pela área sob a curva da glicemia após administração oral de glicose. Contudo, a partir daí, ficou evidente uma compensação pela resposta secretória insulínica das células β do pâncreas, que se manifestou pelo aumento dos níveis plasmáticos de insulina pós jejum ou exposição à glicose gástrica com concomitante redução nos níveis de glicose e frutossamina pós-jejum e pela redução da área sob a curva de glicemia no teste dinâmico.

Os animais utilizados neste experimento desenvolveram alterações radiográficas no arranjo espacial da falange distal no estojo córneo características da laminite e em adição a esse remodelamento do estojo córneo observado os animais desenvolveram de forma concomitante sinais histológicos condizentes com laminite subclínica, que coincidiram com formação de anéis divergentes na parede do casco sem apresentar sintomas característicos da laminite durante o período experimental. A ausência de sintomas corrobora a noção de que o desenvolvimento da laminite endocrinopática possui um caráter mais brando e lento, possuindo uma fase subclínica prolongada evidenciado pelo comportamento podrômico das lesões histopatológicas do tecido laminar

Os parâmetros de adiposidade, os níveis plasmáticos de biomarcadores de alterações endócrinas/metabólicas e as características histopatológicas do tecido lamelar se correlacionaram significativamente em cavalos com obesidade induzida. A avaliação da condição corporal baseada no escore de 1 a 9 se mostrou um método simples e útil para ser utilizado em equinos com fenótipo típico de marchadores nacionais, tanto para avaliar a deposição regional de tecido adiposo, mas também como indicador indireto do desenvolvimento da síndrome metabólica equina baseada na ocorrência de distúrbio metabólico sistêmico e de alterações histológicas no tecido lamelar do casco.

Os achados deste experimento também sugerem que o exame radiográfico seriado e o uso da técnica de biopsia antes da demonstração dos sintomas pode ser um procedimento eficiente no diagnóstico precoce da laminite endocrinopática em equinos.

Em conjunto, a ocorrência destes achados demonstra que o crescente acúmulo de adiposidade regional, o aumento de biomarcadores plasmáticos e a ocorrência de resistência à insulina se correlacionam com o desenvolvimento de alterações no tecido lamelar do casco, podendo ser utilizados como possíveis métodos de diagnóstico precoce para a SME e a laminite endocrinopática equina.